

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis**

**Mírian de Jesus Souza**

**FUNGOS COMO AGENTES DESTOXIFICADORES DE TORTAS DE  
ALGODÃO (*Gossypium*) E PINHÃO-MANSO (*Jatropha Curcas L.*)**

**Diamantina  
2019**

**Mírian de Jesus Souza**

**FUNGO COMO AGENTES DESTOXIFICADORES DE TORTAS DE ALGODÃO  
(*Gossypium*) E PINHÃO-MANSO (*Jatropha Curcas L.*)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em B combustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr.<sup>a</sup> Nísia Andrade Villela D. Pinto

**Coorientador:** Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

**Diamantina**

**2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729f

Souza, Mírian de Jesus

Fungos como agentes destoxificadores de tortas de algodão (*Gossypium*) e pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) / Mírian de Jesus Souza, 2019.

64 p. : il.

Orientadora: Nísia Andrade Villela D. Pinto

Coorientador: Félix Gonçalves de Siqueira

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Basidiomicetos. 2. Ascomicetos. 3. Torta de caroço de algodão. 4. Gossipol. 5. Destoxificação. I. Pinto, Nísia Andrade Villela D. II. Siqueira, Félix Gonçalves de. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 662.669**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa - CRB6/3468

MÍRIAN DE JESUS SOUZA

**FUNGOS COMO AGENTES DESTOXIFICADORES DE TORTAS DE  
ALGODÃO (*Gossypium*) E PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**


Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM BIOCOMBUSTÍVEIS,  
nível de MESTRADO como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nisia  
Andrade Villela Dessimoni Pinto

Data da aprovação : 23/07/2019

  
Prof.Dr.<sup>a</sup> NISIA ANDRADE VILLELA DESSIMONI PINTO - UFVJM

  
Prof.Dr.<sup>a</sup> JULIANA ROCHA DE MEIRA PIRES - IFNMG

  
Prof.Dr.<sup>a</sup> POLIANA MENDES DE SOUZA - UFVJM

DIAMANTINA

*Dedico este trabalho aos professores e colaboradores, que de alguma forma contribuíram com minha formação.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por iluminar os caminhos que escolhi e por colocar pessoas maravilhas que me deram forças nesses caminhos.*

*Aos meus pais, por apoiarem as minhas escolhas e acreditarem sempre em mim. Pelo amor, carinho e exemplo de cidadãos. A toda a minha família por todo o apoio e amizade.*

*A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Nísia A Villela Dessimoni Pinto por suas orientações, ensinamentos, expectativas, paciência, confiança, amizade, carinho e exemplo profissional e humano.*

*Ao meu coorientador Dr. Félix Gonçalves de Siqueira pela confiança concedida, parceria e por todo o auxílio oferecido no desenvolvimento do trabalho.*

*A Prof<sup>a</sup> Vivian Machado Benassi pela parceria, paciência, dedicação, orientações e ensinamentos.*

*A Joice (Embrapa) pela dedicação, empenho e atenção durante o desenrolar do trabalho. A Tatiana, Paula, Mabílli, Tarcísio e Gessica pela colaboração no laboratório.*

*Aos técnicos do laboratório Mayara e Alexandre pela ajuda, companheirismo durante esse tempo de trabalho.*

*A Débora, Thays, Renata e Natália pelo apoio e incentivo.*

*Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta torceram pela minha vitória.*

*“A humildade exprime uma das raras certezas  
de que estou certo: a de que ninguém é superior  
a ninguém.” (Paulo Freire)*

## RESUMO

Na busca de fontes renováveis de energia destaca-se a produção de biodiesel, bicomcombustível obtido pelo processo de transesterificação realizada mediante a mistura de óleo vegetal ou gordura animal em metanol ou etanol, na presença de um catalisador. Um dos principais resíduos gerados pela produção de óleos para obtenção de biodiesel é torta, e que apresenta alto potencial para complementação da alimentação animal. Entretanto algumas tortas apresentam compostos tóxicos naturais em sua composição o que limita seu uso. Entre estas tortas temos a de caroço de algodão, que possui em sua formulação gossipol livre e a torta de semente de pinhão-manso que apresenta ésteres de forbol em sua composição que é tóxico para animais e humanos. Diante da limitação para o uso destas tortas devido á presença de compostos tóxicos, o presente estudo tem como objetivo promover a destoxificação de torta de semente de pinhão-manso (TSPM) e de caroço de algodão (TCA) pelo processo de fermentação em estado sólido usando os fungos filamentosos do filo dos ascomicetos (MB 2.1, MB 2.7 e MB 2.13B) e basidiomicetos (EF 41, EF 71 e EF 79). Os fungos filamentosos que apresentaram maior potencial de redução do gossipol livre foram EF 79, com redução do gossipol livre em 86,67%, e MB 2.7 com redução do gossipol livre em 72,80%. O teor de gossipol livre presente na torta *in natura* era de 8,43 mgg<sup>-1</sup>, após o processo de fermentação o teor foi reduzido para 1,12mgg<sup>-1</sup> com EF 79 e 2,29 mgg<sup>-1</sup> com MB 2.7. Dos fungos utilizados no processo de fermentação para a torta de semente de pinhão-manso, após 15 dias de fermentação EF 71 e MB 2.13B reduziram em meia 90% dos ésteres de forbol. O EF 71 promoveu à redução dos 92,02% dos ésteres de forbol e MB 2.13B a redução de 90,46%. O teor dos ésteres na torta *in natura* era de 1,15 mgg<sup>-1</sup>, após a fermentação com o fungo EF 71 o teor observado foi de 0,09 mgg<sup>-1</sup> e, com o fungo MB2.13B foi de 0,11mgg<sup>-1</sup>. Após o processo cultivo microbiano foi possível a redução dos compostos tóxicos na torta, como também melhorar sua qualidade nutricional, observado por meio dos resultados de análises bromatológicas. Dessa forma o processo de cultivo estado sólido usando os fungos apresentou-se como uma alternativa viável para agregar valor aos resíduos agroindustriais destinados á alimentação animal, que poderão ser confirmados quando dos ensaios *in vivo* com adição de tortas pré-tratadas biologicamente pelos fungos insumos para composição de ração de animais (monogástricos ou poligástricos).

**Palavras chave:** Basidiomicetos, ascomicetos, torta de caroço de algodão, gossipol, torta semente de pinhão-manso, éster de forbol, destoxificação



## ABSTRACT

In the search for renewable sources of energy, stand out the biofuel production obtained through the transesterification process performed by mixing vegetable oil or animal fat in methanol or ethanol, in the presence of a catalyst. One of the main residues generated by the production of oils to obtain biofuel is cake, which has high potential for complementing animal food. However some cake has natural toxic compounds in their composition which limits their use. Among these cakes are the cottonseed, which has in its formulation free gossypol and the jatropha seed cake that has esters of phorbol in its composition which is toxic to animals and humans. Given the limitation for the use of these cakes due to the presence of toxic compounds, the present study aims to promote the detoxification of *Jatropha curd* (TSPM) and cottonseed seed cake (TCA) by the solid state fermentation process. Using the filamentous fungi of the Ascomycete phylum (MB 2.1, MB 2.7 and MB 2.13B) and Basidiomycetes (EF 41, EF 71 and EF 79). The filamentous fungi with the highest potential for free gossypol reduction were EF 79, with free gossypol reduction by 86.67%, and MB 2.7 with free gossypol reduction by 72.80%. The free gossypol content present in fresh cake was 8.43 mgg-1, after the fermentation process the content was reduced to 1.12mgg-1 with EF 79 and 2.29 mgg-1 with MB 2.7. From the fungi used in the fermentation process for jatropha seed cake, after 15 days of fermentation EF 71 and MB 2.13B reduced by 90% of phorbol esters. The EF 71 promoted a reduction of 92.02% of phorbol esters and MB 2.13B a reduction of 90.46%. The esters content in fresh cake was 1.15 mgg-1, after fermentation with the fungus EF 71 the observed content was 0.09 mgg-1 and with the fungus MB2.13B was 0.11mgg-1. 1. After the microbial cultivation process it was possible to reduce the toxic compounds in the cake, as well as improve its nutritional quality, observed through the results of bromatological analysis. Thus the solid state cultivation process using the fungi presented as a viable alternative to add value to the agroindustrial residues destined for animal food, which can be confirmed by the in vivo tests with the addition of pre-treated cakes biologically treated by the fungi to animal food composition (monogastric or polygastric).

**Keywords:** Basidiomycetes, ascomycetes, cottonseed cake, gossypol, jatropha seed cake, phorbol ester, detoxification

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura química do Gossipol.....   | 19 |
| Figura 2: Estrutura química do éster de forbol.....  | 24 |
| Figura 3: Fungos utilizados no processo de fermentação da TCA e TSPM.....  | 31 |
| Figura 4: Torta de caroço de algodão pré e após o processo de fermentação.....   | 32 |
| Figura 5: Torta de semente de pinhão-manso pré e após o processo de fermentação.....   | 33 |
| Figura 6: Porcentagem da degradação do gossipol livre na torta de caroço de algodão tratada, quando comparado à concentração do gossipol livre na torta <i>in natura</i> .....           | 40 |
| Figura 7: Cinética da degradação do gossipol na torta de caroço de algodão após a fermentação.....   | 41 |
| Figura 8: Porcentagem de degradação dos ésteres de forbol da torta de semente de pinhão-manso tratada, quando comparado à concentração do gossipol livre na torta <i>in natura</i> ..... | 44 |
| Figura 9: Cinética de degradação dos ésteres de forbol na torta de pinhão-manso após a fermentação.....  | 45 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela1: Fungos utilizados no processo de fermentação da torta de caroço de algodão e semente de pinhão-manso.....                                | 30 |
| Tabela 2: Concentração de gossipol livre ( $\mu\text{gg}^{-1}$ ) presente na torta de caroço de algodão antes e após o processo fermentativo..... | 39 |
| Tabela 3: Concentração dos ésteres de forbol ( $\text{mgg}^{-1}$ ) na torta de semente de pinhão-manso antes a após o processo fermentativo.....  | 43 |
| Tabela 4: Análise da concentração de compostos fenólicos na torta de caroço de algodão e pinhão-manso pré e após processo de fermentação.....     | 46 |
| Tabela 5: Análise da atividade antioxidante na torta de caroço de algodão e pinhão-manso pré e após processo de fermentação.....                  | 47 |
| Tabela 6: Análise da composição centesimal da torta de caroço de algodão antes a após o processo fermentativo.....                                | 48 |
| Tabela 7: Composição centesimal da torta de semente de pinhão-manso antes após o processo fermentativo.....                                       | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT: Atividade Antioxidante Total

AOAC: Association Of Analytical Communities

AOAS: American Oil Chemists' Society

ATT: Acidez Total Titulável

BDA: Batata-Dextrose-Ágar

CZ: CINZAS

DPPH: Radical Livre 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila

EF 41: *Hydnopolyporus fimbriatus*

EF 71: *Oudemansiella canarii*

EF 79: *Perenniporia spp*

EF: Ésteres De Forbol

FB: Fibra Bruta

GL: Gossipol

IAL: Instituto Adolfo Lutz

LP: Lipídios

MB 2.1: *Aspergillus sp.*

MB 2.13B: *Aspergillus sp.*

MB 2.7: *Aspergillus sp*

MS: Matéria Seca

PB: Proteína

PDA: Photodiodearray

pH: Potencial Hidrogeniônico

SST: Sólidos Solúveis Totais

TCA: Torta De Carço De Algodão

TFA: Ácido Trifluoracético

TSPM: Torta De Semente De Pinhão-Manso

UHPLC: Cromatógrafo Líquido De Ultra Performance

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1 Objetivo Geral.....   | 17        |
| 2.2 Objetivos Específicos.....  | 17        |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                    | <b>18</b> |
| 3.1 Torta de caroço de algodão e gossipol.....                          | 18        |
| 3.2 Torta de pinhão-manso e ésteres de forbol.....                      | 22        |
| 3.3 Fungos: basidiomicetos e ascomicetos.....                           | 27        |
| 3.4 Fermentação em estado sólido.....                                   | 29        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                      | <b>30</b> |
| 4.1 Obtenção das tortas.....  | 30        |
| 4.2 Coleção de fungos.....  | 30        |
| 4.3 Cultivos dos fungos nas tortas.....                                 | 31        |
| 4.3.1 Cultivo na torta de algodao.....                                  | 31        |
| 4.3.2 Cultivo na torta de pinhão-manso.....                             | 32        |
| 4.4 Extração e determinação das concentrações de gossipol livre.....    | 33        |
| 4.5 Extração e Determinação das concentrações de ésteres de forbol..... | 34        |
| 4.6 Determinação dos compostos fenólicos totais.....                    | 35        |
| 4.7 Determinação da atividade antioxidante total (AAT).....             | 36        |
| 4.8 Composição centesimal.....  | 36        |
| 4.9 Análises estatísticas.....  | 37        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                   | <b>38</b> |
| 5.1.1 Determinação das concentrações de gossipol livre.....             | 38        |
| 5.1.2.Cinética de alteração de GL durante as fermentações.....          | 40        |
| 5.2.1 Determinação das concentrações dos ésteres de forbol.....         | 42        |
| 5.2.2 Cinética de degradação dos ésteres de forbol.....                 | 44        |
| 5.3 Compostos fenólicos.....  | 46        |
| 5.4 Atividade antioxidante.....   | 47        |
| 5.5 Composição centesimal.....  | 47        |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>            | <b>51</b> |
| <b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b> | <b>52</b> |
| <b>8. REFÊRENCIAS.....</b>          | <b>53</b> |
| <b>9. ANEXOS.....</b>               | <b>60</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente preconiza a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo. As pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo, e coloca as biomassas oleaginosas vegetais em um papel de destaque, em razão da sua natureza renovável. Desde a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao diesel o Brasil busca aumentar a participação de fontes de energia renováveis em sua matriz energética com uma participação em torno de 43,8% (LEONETI *et al.*, 2012).

A produção de biodiesel, a partir dessas fontes de vegetais, gera uma quantidade significativa de coprodutos para a alimentação animal, sendo usados como fonte nutricional, devido ao elevado teor de proteínas. Basicamente estarão disponíveis para a alimentação animal a torta, se a extração do óleo for física (prensagem), ou o farelo, quando o material é submetido à extração química (com solventes) após o processo de extração física (ABDALLA *et al.*, 2008; PERREIRA, 2011). Alguns setores da agroindústria geram centenas de toneladas de resíduos que por vezes não são totalmente utilizados ou são pouco reutilizados. Visando maior aproveitamento desses resíduos diversos estudos buscam alternativas para a utilização das tortas ou farelos das oleaginosas na alimentação animal, entretanto, cada uma apresenta particularidades no que diz respeito a cuidados antes de serem fornecidas aos animais devido à presença de fatores tóxicos ou antinutricionais (RODRIGUES & RONDINA, 2013). O uso destes subprodutos na alimentação animal permite o aumento da produtividade e contribui para menor emissão de gases de efeito estufa pelos animais, gerando créditos de carbono e atendendo ao interesse da iniciativa privada (ABDALLA *et al.*, 2008).

A semente de algodão é uma das mais importantes fontes de óleo vegetal de boa qualidade, e sua torta rica em proteína é utilizada como suplemento proteico na alimentação animal (EMBRAPA, 2017). Tem sido demonstrada a viabilidade do uso do óleo de algodão como matéria prima para a produção de biodiesel. A semente de algodão tem sido utilizada para alimentação de ruminantes, pois apresentam alto valor energético devido ao seu elevado teor de óleo, proteína e fibra. Entretanto o caroço de algodão apresenta limitação quanto ao seu uso na dieta de animais devido ao teor de gossipol (ROMERO, 2013).

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa que possui alta produção de grãos e óleo vegetal, pertencente à família Euphorbiaceae, que pode ser encontrado na forma de árvore ou arbusto aleatoriamente na natureza ou como cercas vivas (NASCIMENTO, 2013). O principal subproduto da produção de biodiesel a partir do pinhão-manso é a torta. Essa torta é rica em proteína bruta, no entanto, apresenta teores de compostos tóxicos e antinutricionais impedindo a sua utilização diretamente na alimentação animal, tais como ésteres de forbol, lectina inibidor de tripsina e fitato. Os ésteres de forbol são os principais componentes tóxicos presentes das sementes e sua concentração varia de acordo com a variedade de pinhão-manso analisada (RODRIGUES, 2015).

As tortas tóxicas dessas oleaginosas podem ser destoxificadas por métodos químicos, físicos ou biológicos. A biodestoxificação de biomassas residuais já é uma realidade e tem se mostrado eficiente, seja ela bacteriana, enzimática ou fúngica. Os fungos são organismos extremamente importantes na produção de alimentos como os produtos fermentados, bebidas alcoólicas, na indústria farmacêutica, no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes. Uma aplicação dos fungos que vem crescendo nos últimos anos é sua utilização na agricultura para degradação de substâncias tóxicas (ABREU *et al.*, 2015). Eles estão sendo empregados em resíduos de biodiesel destinados a ração animal, pois melhoraram a qualidade nutricional, elevando seu teor proteico e degrada à lignina, aumentando a fração hemicelulósica e digestibilidade (WANG *et al.*, 2012; ZILIOTTO, 1997). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) o cultivo de macrofungos em resíduos agroindustriais abundantes é uma alternativa lucrativa e economicamente viável como por exemplo no cultivo de cogumelos comestíveis. Entretanto há necessidade de estudos para conhecimento desses resíduos e de seus tratamentos antes de oferecê-los à animais, uma vez que ruminantes e monogástricos possuem exigências nutricionais diferentes (VILLAS BOAS *et al.*, 2002; OWEN *et al.*, 2012).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a capacidade de fungos basidiomicetos e ascomicetos em degradar gossipol livre (GL) em torta de caroço de algodão (TCA) e ésteres de forbol (EF) em torta de semente de pinhão-manso (TSPM) quando cultivados por fermentação em estado sólido (FES) visando à utilização destas tortas na alimentação animal.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Determinar as concentrações de GL na TCA pré e pós cultivos fungicos;
- ✓ Determinar as concentrações EF na TSPM pré e pós cultivos fungicos;
- ✓ Selecionar os fungos filamentosos com maior eficiência na degradação GL na TCA e EF na TSPM durante os cultivos fungicos por meio da avaliação cinética de degradação dos mesmos;
- ✓ Determinar a composição centesimal das TCA e TSPM pré e pós cultivos fungicos.
- ✓ Determinar os teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total das TCA e TSPM pré cultivos fungicos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

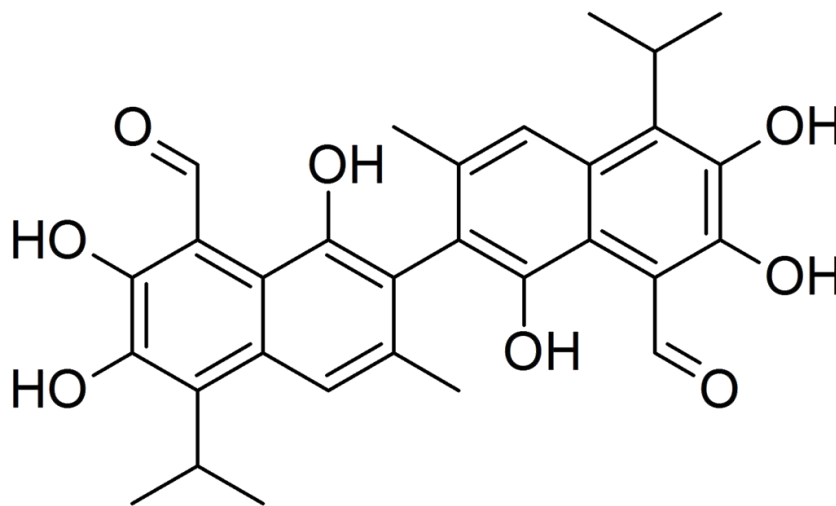
#### 3.1 Torta de caroço de algodão e gossipol

O algodoeiro é uma planta dicotiledônea, da família Malvaceae, sendo várias espécies do gênero botânico *Gossypium L.* A fibra é o principal produto do algodoeiro, apresentando inúmeras aplicações nas industriais, entre as quais confecção de fios para tecelagem, algodão hidrófilo para enfermagem, confecção de feltro de cobertores, de estofamentos, obtenção de celulose, entre outros. O algodoeiro é cultivado no Brasil, em três macrorregiões, a Norte–Nordeste, na Centro–Oeste e na Sul–Sudeste. Em todas elas encontram-se diferentes sistemas de produção, desde pequenas glebas, de agricultura familiar, até culturas empresariais, de alto nível tecnológico. O algodoeiro é uma planta exigente, quanto à qualidade do solo, com um ciclo de aproximadamente 160 dias, e dependendo do desenvolvimento e produção das plantas, um suprimento de 750 a 900 mm de água, bem distribuídos no período. Após os 130 dias de idade da cultura, chuvas excessivas ou persistentes comprometem a produção e a qualidade do produto. Durante todo o ciclo, necessita de dias predominantemente ensolarados, com temperaturas médias entre 22 e 26°C (BIODIESELBR, 2017; SEAGRI, 2012).

A semente de algodão é uma das mais importantes fontes de óleo vegetal de boa qualidade, é muito rica em proteína, utilizada como suplemento protéico na alimentação animal (EMBRAPA, 2017). Tem sido demonstrada a viabilidade do uso do óleo de algodão como matéria-prima para a produção de biodiesel. O algodão é uma planta singular, pois é fibrosa e oleaginosa, com teor de óleo variando entre 14 a 25 %. Estudos mostraram conversão de 98,6 % do óleo de algodão em ésteres etílicos (biodiesel) apresentando características físico-químicas: índice de acidez 0,55 mgg<sup>-1</sup>, densidade 0,876 a 20 °C (g/cm<sup>3</sup>), índice de saponificação 190 mgKOk/g, índice de iodo 99,9 g100g<sup>-1</sup>, índice de cetano 44 mínimo e ponto de fulgor de 160 °C (BELTRÃO & OLIVEIRA, 2008).

Devido ao alto teor de óleo e qualidade do óleo, o algodão também é matéria-prima para a produção de biocombustíveis, ocupando no Brasil, lugar de destaque na produção de biodiesel, sendo as principais fontes soja e sebo (MOTTA, 2014; CREMONEZ *et al.*, 2015; BIODIESELBR, 2017). Os principais componentes do óleo de algodão são: ácido linoleico (46,7%-58,2%) e palmítico (21,4%-26,4%) em maior porcentagem, seguidos por ácido oléico (14,7%-21,7%) e esteárico (2,1%-3,3%), de acordo com o Codex Alimentarius (FAO, 2015; WHO, 2015). Um dos produtos oriundos da produção de biodiesel é a torta de

O gossipol é um aldeído polifenólico produzido por glândulas de secreção interna do algodoeiro (*Gossypium* spp) considerado um terpeno incomum que confere à planta resistência contra pragas, incrementando a sobrevivência do vegetal. O gossipol apresenta-se como uma mistura de esteroisômeros (+) e (-), com o isômero negativo (-) apresentando maior atividade biológica. O gossipol aparece nas plantas como pequenas manchas pretas distribuídas nas folhas, sementes e raízes. Por esse motivo existem limitações ao fornecimento de caroço de algodão na alimentação animal, pois em altas quantidades pode causar infertilidade em machos (SALDANHA & BELO, 2016; McCAUGHEY *et al.*, 2005; GADELHA *et al.*, 2011).



Nas plantas o gossipol é encontrado de duas formas, a forma livre e a conjugada. Os grupos aldeídos presentes no gossipol reagem facilmente com as aminas presentes nas cadeias laterais de aminoácidos, levando à formação do chamado gossipol conjugado. A forma conjugada é produzida através de ligações covalentes do gossipol livre com grupos épsilon-amino de lisina e arginina. A forma de gossipol conjugado não é extraível com solventes orgânicos, mas pode ser liberado como gossipol livre por

tratamento com ácidos. O gossipol conjugado é formado durante o armazenamento de produtos de algodão e sua formação é acelerada pelo calor e umidade, condições encontradas durante o processamento de sementes de algodão. Embora o gossipol conjugado seja considerado menos absorvível pelo epitélio intestinal, ocorre a redução da disponibilidade de aminoácidos para a absorção pelo animal, principalmente a lisina (CÂMARA, 2015).

A concentração de gossipol no algodoeiro pode variar de acordo com a espécie e variedade da planta, a temperatura, o solo, a disponibilidade de água, o fertilizante utilizado e o estágio vegetativo, e encontra-se entre 0,8% a 1,4% da matéria seca da semente. A presença de gossipol no algodoeiro tem relação positiva com a umidade dos solos e negativa com altas temperaturas. Geralmente, o caroço de algodão íntegro apresenta todo o seu conteúdo de gossipol na forma livre (MORGAN, 1989; RANDEL *et al.* 1992;; EMBRAPA, 2017; ROGERS *et al.*, 2002).

Estudos mostram que o gossipol pode reduzir a capacidade carreadora de oxigênio no sangue, resultando em respirações curtas e edemas pulmonares. Os sinais de intoxicação aguda pelo gossipol incluem dificuldade de respiração, dispnéia, diminuição da taxa de crescimento, anorexia, fraqueza, apatia e morte depois de vários dias. Após mortes por consumo de gossipol, análises de necrópsia indicaram derrames pleural e abdominal, necrose centrolobular do fígado, edema generalizado, congestão dos pulmões e do fígado e degeneração das fibras cardíacas, podendo provocar morte súbita em bezerros (PAIM *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2014; GADELHA *et al.*, 2011).

O gossipol é considerado tóxico para espécies não ruminantes e ruminantes, seus efeitos tóxicos, entretanto são maiores para os monogástricos, como suínos e aves, que são bastante suscetíveis à toxicidade de gossipol, assim como os pré-ruminantes, podendo reduzir a capacidade carreadora de oxigênio no sangue, resultando em respirações curtas e edemas pulmonares. Alguns sinais de toxicidade do gossipol foram relacionadas a uma diminuição das concentrações de antioxidantes e um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, pois o gossipol pode interagir com membranas biológicas, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio. Estudos sugeriram que os antioxidantes desempenham um papel fundamental no metabolismo de gossipol. Em altas doses, o gossipol também reduz a atividade de sistemas enzimáticos de cadeias de transporte de elétrons mitocondrial e desconecta os processos de respiração e fosforilação (GADELHA *et al.*, 2011).

Os sinais da intoxicação aguda são correlacionados à redução da capacidade carreadora de oxigênio no sangue, resultando em respirações curtas e edemas pulmonares. A ocorre por meio da ingestão prolongada, uma vez que os níveis desta substância no algodão não são suficientemente altos para poder promover intoxicação aguda (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA *et al.*, 2011). O gossipol é um pigmento amarelado tóxico que age como inibidor da atividade de diversas enzimas, tais Mg-ATPase e Ca-Mg-ATPase nas membranas plasmáticas dos espermatozoides. Estudos mostram que o gossipol interfere na reprodução, animais fêmeas expostas a esta substância apresentaram interferência no ciclo estral, gestação e no desenvolvimento embrionário inicial (RANDEL *et al.*, 1992; 1996; GADELHA *et al.*, 2011). Em roedores, o gossipol promoveu aumento no número de ciclos estrais irregulares (LIN *et al.*, 1985), diminuição da taxa de prenhez. Devido ao poder de provocar esterilização, o uso desse composto como um fármaco para supressão da espermatogênese em humanos advém da década de 80, o Gossipol foi estudado experimentalmente para sua utilização como um contraceptivo na medicina humana. (QIAN *et al.*, 1980). No entanto, sua segurança tem sido questionada devido à ocorrência de esterilidade irreversível e hipocalcemia severa, com conseqüente fadiga e apatia (KOGAN & WALD, 2014).

Estudos mostram que a quantidades máximas de caroço de algodão na dieta animal ruminante é de 15%, o que minimiza os efeitos prejudiciais do excesso de gordura sobre a digestibilidade da fibra. Dietas com até 30 mg de gossipol por quilo de peso vivo não causam efeito tóxico sobre a quantidade e qualidade do sêmen. Em fêmeas o consumo de mais de 36,0 mg de gossipol livre/kg de peso vivo resulta em redução na qualidade e desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* (PIRES *et al.*, 1997). O gossipol não é metabolizado pelos microrganismos do rúmen e, por isso, é necessária atenção aos teores de gossipol nas dietas, principalmente, para animais com alta ingestão de matéria seca, como animais de alta produção.

Para o aproveitamento da torta de algodão, diversos estudos vêm sendo realizados visando seu processo de destoxificação. Nagalakshmi e colaboradores (2003) concluíram que o cozimento e o tratamento com hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$  podem ser usados em subprodutos do algodão, visando a diminuição dos efeitos do gossipol nos animais. A peletização é outro processamento que contribui para diminuir este potencial, que consiste em provoca modificação nas propriedades químicas do gossipol por meio do calor úmido (IEPEC, 2018).

Outra forma para obtenção sementes de algodão atóxicas é o melhoramento genético da planta, obtendo variedades com baixos teores de gossipol. O cultivo de algodão sem gossipol livre ou reduzido ampliaria o uso da torta e do farelo na alimentação animal (monogástricos e poligástricos) como também na alimentação humana, entretanto como o gossipol é um composto que inibi o ataque a pragas, essas variedades não alcançariam o mercado, pois ficaram mais suceptíveis a infestação de insetos e outras pragas (ARAÚJO *et al.*, 2003; EMBRAPA, 201). Os tratamentos biológicos para destoxificação da torta de caroço de algodão usando microrganismos vêm ganhando força por meio dos resultados científicos divulgados nos últimos anos. Microrganismos como *Aspergillus oryzae* (LIM; LEE, 2011), *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* (ZHANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2011) apresentaram resultados positivos na degradação de gossipol livre. Os macrofungos também ganharam destaque nestas ações, incluindo basidiomicetos degradadores de gossipol e ésteres de forbol em meio líquido. ARAÚJO *et al.* (2015) avaliou o potencial de macrofungos com agentes desconstrutores e destoxificadores de estruturas e biomoléculas presente no caroço de torta de algodão. CUNHA *et al.* (2018) estudou o potencial de macrofungos da biodiversidade amazônica para degradação de ésteres de forbol presente na torta de pinhão-mansão. Os macrofungos também apresentam potencial para serem usados na alimentação, pois alguns são comestíveis, GOMES *et al.* (2015) avaliou a degradação de ésteres de forbol em torta de pinhão-mansão e a produção de macrofungos comestíveis.

### **3.2 Torta de pinhão-mansão e ésteres de forbol**

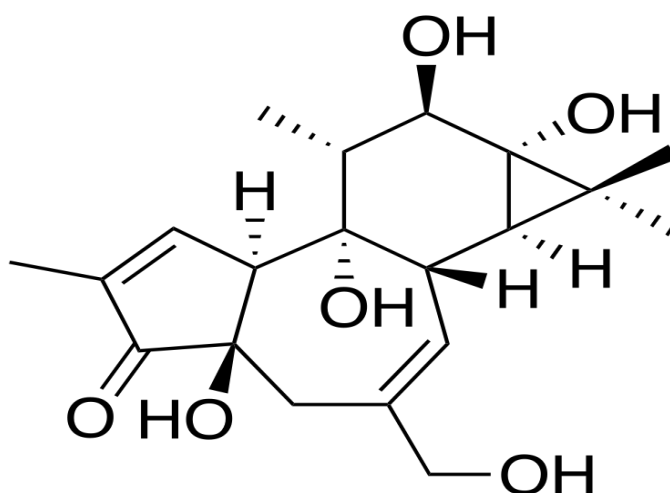
O gênero *Jatropha* é originário da América tropical, com aproximadamente 170 espécies, incluindo o pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). Essa espécie está presente em áreas de mata nativa e é cultivada das Américas do Sul e Central, África, Índia, sudeste da Ásia e Austrália. O gênero possui diversos compostos com atividades biológicas variadas, além da presença de óleo em seus frutos, considerado uma cultura rústica, adaptada às mais diversas condições climáticas, que sobrevive bem em condições de solos marginais de baixa fertilidade natural. O pinhão-mansão é uma espécie perene pertencente à família das Euforbiáceas, mesma família da mamona, mandioca e seringueira, e está amplamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais (ARRUDA *et al.*, 2004; CARELS, 2009; LAVIOLA & DIAS, 2008).

O pinhão manso produz sementes de fácil colheita ricas em óleo, razão que o torna competitivo internacionalmente. Suas características também superam o padrão de qualidade do óleo de colza (canola) comercializado, hoje, na Europa (DABDOUB *et al.*, 2009). É uma espécie com muitas utilidades e atributos, apresentando usos na medicina tradicional humana e animal, na produção de sabão, cosméticos e adubo orgânico (OPENSHAW, 2000). O pinhão-manso destaca-se entre as oleaginosas com potencial para a produção de biodiesel, apresentando características desejáveis como: potencial de altos rendimentos de grãos e óleo, boa qualidade do óleo para a produção de biodiesel, adaptabilidade a diferentes regiões, precocidade e longevidade. É uma planta considerada tolerante à seca, tem menos necessidade de nutrientes, utiliza insumos trabalhistas mais baixos e não compete com a produção de alimentos se cultivada em terras marginais, tornando uma planta oleaginosa com potencial para o desenvolvimento ambiental sustentável (PANDEY *et al.*, 2012).

Cerca de 60,% do teor médio de óleo encontrado nas sementes são compostos basicamente por 14,3% de ácido palmítico, 5,1% de ácido esteárico, 41,1% de ácido oléico e 38,1% de ácido linoleico; possuindo ao final um valor médio de 20% de ácidos graxos saturados e 80% de ácidos insaturados. Entretanto, assim como nas demais culturas oleaginosas, a composição e teor de cada ácido graxo de óleos vegetais com potencial para biocombustíveis podem variar de acordo com as condições climáticas, classe de solo, localização geográfica, estágio de maturação das sementes, variedades e práticas agronômicas, entre outros fatores (RODRIGUES *et al.*, 2013; SINHA *et al.*, 2015).

A torta é o resíduo resultante da prensagem dos grãos de pinhão-manso para a extração do óleo. A composição da torta pode variar em função do modo de extração (prensa mecânica ou extração por solvente), do tipo de grãos e do teor de óleos nos grãos. Estudos sobre a composição indicam que a torta de pinhão-manso é rica em proteína, podendo chegar a 46%, dependendo do método de extração do óleo. Devido ao alto valor proteico e à qualidade de suas proteínas, com relação à composição de aminoácidos, a torta de pinhão-manso possui um potencial para uso na nutrição animal. Até o momento, porém, este uso está impossibilitado devido à presença de fatores antinutricionais e de componentes tóxicos (GONÇALVES *et al.*, 2009; DURÃES *et al.*, 2011).

O principal componente tóxico nas sementes e na torta de pinhão-manso é o éster do forbol, é tóxico para animais, como bovinos, suínos e aves, podendo agir de duas formas: crônica (indução na formação de tumores) e aguda (resposta inflamatória intensa). Os ésteres de forbol são diterpenos tetracíclicos derivados do composto tiglane, são metabólitos secundários de plantas, desempenhando papéis importantes no desenvolvimento e crescimento, interações ecológicas e defesa contra patógenos e pragas. Estudos já caracterizaram 6 tipos diferentes de éster de forbol (isômeros) em *Jatropha curcas* e todos possuem a mesma estrutura primária 12-desoxi-16-hydroxyphorbol, e, são nomeados como fatores de *Jatropha* C1-C6 conforme a distribuição de carbonos nas cadeias laterais (GOEL *et al.*, 2007).



**Figura 2:** Estrutura química do éster de forbol **Foto:** Charlesy, 2009

Na forma aguda, a intoxicação por ésteres de forbol se manifesta por uma resposta inflamatória intensa, que é um dos primeiros sintomas. No caso de contato, a inflamação ocorre geralmente na área de contato e olhos, e no caso de ingestão essa inflamação será principalmente no estômago. Na toxicidade crônica promove crescimento de tumores pelo mecanismo de ligação, pois este imita a ação do diacilglicerol, composto responsável por ativar a proteína quinase C (PKC), a qual regula o crescimento e diferenciação celular. A ativação prolongada dessa enzima pode levar a uma resposta miogênica, aumentando a eficácia de agentes cancerígenos. Os ésteres de forbol são considerados co-carcinógenos, pois não induzem a formação de tumor, mas promovem seu crescimento (SHARATH *et al*, 2014).



Diversos estudos com animais, ruminantes (bovinos e caprinos) ou não-ruminantes (camundongos, ratos, frangos, peixe, humanos), demonstraram que as sementes são tóxicas. Em ruminantes foram testadas doses agudas de 2,5g sementes/Kg de peso do animal/dia e crônicas 0,025g sementes/Kg de peso do animal/dia por 14 dias e, que levaram todos os animais à morte. Os primeiros sinais foram de diarreia, dispnéia, desidratação e perda de condição geral, associados com alguns achados patológicos. Os ésteres de forbol são compostos termicamente estáveis e podem suportar a temperatura de até 160 °C durante 30 minutos. Estudos mostraram que é possível reduzir os níveis desses ésteres em tortas ou farelos pela combinação de tratamentos químicos e térmicos (CRUZ, 2012; MAKKAR *et al.*, 1997; RAKSHIT *et al.*, 2008).

A TSPM é um excelente adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio. No entanto, poder-se-ia dar esta destinação às cascas dos frutos e das sementes, aproveitando a torta rica em proteína (46-63%, dependendo do método de extração do óleo) como suplemento proteico altamente nutritivo na ração de ruminantes de pequeno e grande porte, entretanto o uso da torta para esta finalidade está impossibilitado devido à presença de fatores limitantes tóxicos (ésteres de forbol). Embora, o gênero *Jatropha* apresenta-se predominantemente composto por espécies tóxicas, existem espécies com baixos teores dos ésteres de forbol, considerados naturalmente atóxicos. A concentração de ésteres de forbol varia de acordo com o acesso genético de *Jatropha curcas* usado. Fatores como clima e altitude também influenciam no teor de éster de forbol na semente. A concentração pode variar de 0,82 a 3,85 mgg<sup>-1</sup> na semente e de 2 a 4 mgg<sup>-1</sup> no óleo. No México foram encontradas variedades de pinhão-mansos livres de ésteres de forbol ou em quantidades mínimas, uma delas considerada atóxica, a qual apresentou baixo teor de ésteres de forbol (0,11 mg g<sup>-1</sup>), enquanto que nas variedades tóxicas foram encontrados valores elevados, com teor máximo de 2,70 mg g<sup>-1</sup> de ésteres de forbol (MAKKAR *et al.*, 1997; MAKKAR *et al.*, 2008).

Mesmo com a toxicidade do pinhão-mansoso, várias regiões utilizam todas as partes da planta na medicina tradicional para tratar doenças humanas e de animais. De acordo com GUBITZ *et al.*, (1999) a decocção preparada com as folhas é utilizada como remédio para tosse e anti-séptico. Na Índia suco das raízes e o látex do pinhão manso são utilizados para tratar inflamações genitais (MEENA & YADAV, 2010). Na Itália as folhas, o caule, as raízes e as sementes são indicadas como anti-helmínticos (DIELH *et al.*, 2004). Na medicina

etnoveterinária, o suco obtido dos frutos é utilizado como antiinflamatório (GRADÉ *et al.*, 2009). Os principais constituintes para tais tratamentos detectados nas sementes são a toxoalbumina curcina, ésteres de forbol, terpenos e taninos (ABDEL GADIR *et al.*, 2003; ILELABOYE & PIKUDA, 2009). Estudos realizados em camundongos por SHETTY e colaboradores (2006) verificaram que o extrato bruto de pinhão-mansinho acelerou o processo de cicatrização de feridas por vários mecanismos ainda não esclarecidos.

Os coprodutos da extração do óleo de pinhão-mansinho, livres de substâncias tóxicas, seriam um alimento alternativo, de baixo custo com alto valor nutricional. O principal interesse da sua utilização está relacionado com a qualidade e quantidade significativa de proteína, nitrogênio, potássio e sódio além de outros componentes nutricionais importantes na alimentação animal presentes nesta oleaginosa. Vários tratamentos para a eliminação dos ésteres de forbol vêm sendo estudados, tais como tratamento físico-químico, solventes orgânicos e inorgânicos, mas esses procedimentos não são apenas caros, mas também têm alguns impactos negativos no meio ambiente. PHASUKARRATCHAI *et al.* (2012) utilizou a luz solar e a luz fluorescente para acelerar a degradação dos ésteres. Outro método é a extração química dos ésteres, através do emprego de surfactantes e solventes orgânicos, Guedes *et al.* (2014) observaram redução de 97,30% a concentração dos ésteres em torta após um processo de extração de 8 horas.

Aplicação de microorganismos capazes de degradar os compostos tóxicos presente no pinhão-mansinho representa uma estratégia promissora para a eliminação dos ésteres de forbol. BELEWU e SAM (2010) utilizaram os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus nigricans* e *Trichoderma longibrachitum* na degradação de ésteres de forbol em condições de fermentação no estado sólido (FES). VEERABHADRAPPA *et al.* (2014) observaram degradação significativa dos ésteres com *Aspergillus versicolor*, relatando uma redução de 81,1% nos níveis de ésteres de forbol após a FES. Além dos fungos, algumas bactérias também mostraram-se promissoras na degradação dos ésteres de forbol observou redução de 92,78% dos ésteres utilizando uma cepa da bactéria Gram-negativa *Morganella morganii*, isolada de material de sementes de sementes de *J. Curcas*, após 4 dias de incubação. *Pseudomonas aeruginosa* também tem sido efetivamente empregada na degradação dos ésteres, com degradação completa dos ésteres na biomassa sólida residual após 9 dias. Cinco linhagens de *Bacillus* sp. degradaram de 76,5% a 92,0% dos EF após 3 dias de cultivo, e 100% em de sete dias (CHANG *et al.*, 2018).

### 3.3 Fungos: basidiomicetos e ascomicetos

Os fungos são popularmente conhecidos como mofos e bolores, sendo lembrado na maior parte das vezes somente pelos danos que algumas espécies causam, entretanto os fungos proporcionam inúmeros benefícios, tais como: ação fermentativa de fungos na síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, os quais são imprescindíveis na produção de bebidas como vinho e cerveja, alimentos como pães e massas em geral. Algumas espécies podem ainda proporcionar sabor e aroma distintos em diferentes tipos de queijos. O consumo de cogumelos comestíveis é prática comum entre populações de vários países, principalmente os orientais, e em nosso país, sua utilização vem crescendo a cada dia (SILAVA & COELHO, 2006).

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haploides (homo ou heterocarióticos), com parede celular contendo quitina e alfa-glucano. Não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfologicamente semelhantes a estas. Os esporos ou conídios, para germinarem, necessitam de calor e umidade e o resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos ou hifas (quando fungo filamentoso). Estes tubos se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada micélio, que constitui o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos alimentos. Os filamentos simples ou ramificados que formam o micélio são denominados hifas. Na maioria dos casos, o sistema vegetativo encontra-se no interior dos tecidos parasitados, no solo ou na matéria orgânica em decomposição. Com a formação dos esporos ou conídios é necessário que estes tenham acesso livre ao ar, para assegurar sua disseminação. Realiza-se, então, uma diferenciação das hifas vegetativas, geralmente levantadas verticalmente sobre o plano do micélio, conhecido como esporóforo ou conidióforo, e sobre estes se originam os esporos ou conídios. As hifas, por sua vez, podem ser apocíticas (com septo) ou cenocíticas (sem septo). O ciclo de vida dos fungos compreende duas fases. Uma somática, caracterizada por atividades alimentares, e outra reprodutiva, onde os fungos podem realizar reprodução sexuada ou assexuada. As estruturas assexuadas, como também as sexuadas, podem ser formadas isoladamente ou em grupos, neste caso, formando corpos de frutificação. Assim, conídios podem ser formados em conidióforos isolados ou agrupados, constituindo então os conidiomas. Os esporos

podem ser formados em ascomas, onde são formados os ascos ou basidiomas, onde são formados os basídios (MOLINARO, et al., 2012). A classificação mais moderna dos fungos reconhece sete filos: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (TAKAHASHI, 2017).

Os basidiomicetos são fungos que pertencem ao filo Basidiomycota, divididos em três classes: Basidiomycetes (basidiomicetos, macrofungos comestíveis), Teliomycetes e Ustomycetes. Os fungos filamentosos que formam basidiomas (cogumelos), sendo classificados como macrofungos. Essa caracterização se deve pela presença de uma estrutura conhecida como basídio, localizado na extremidade distal de uma hifa binucleada, na parte inferior do píleo. Os basídios contêm núcleos que sofrem mitoses e os núcleos haplóides resultantes são contidos nos basidiósporos, estes por sua vez são lançados ao meio ambiente (na fase de frutificação) e assim reinicia o novo ciclo de vida desses macrofungos (SILVA & COELHO, 2006). Os macrofungos apresentam capacidade de produzir simultaneamente enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradar substratos ligninocelulósicos, são degradadores ativos de lignina nas florestas. Também são empregados em resíduos destinados a ração animal, uma vez que melhoraram a qualidade nutricional do mesmo com enriquecimento proteico, degradação da lignina, aumento da fração hemicelulósica e da digestibilidade (GOMES, 2015). O cultivo desses fungos em resíduos agroindustriais abundantes torna-se uma alternativa lucrativa e economicamente viável.

O filo Ascomycota é o maior grupo do Reino Fungi, possui três subfilos, 15 classes, 68 ordens, 327 famílias. Os fungos pertencentes ao filo Ascomycota possuem estruturas multicelulares, sua reprodução pode ser do tipo assexua ou sexual. A reprodução assexua pode ocorrer por brotação, fragmentação das hifas, produção de conídios e de clamidiósporos. Enquanto que a reprodução sexual pode iniciar-se por um dos seguintes modos: copulação gametangial, contato gametangial, espermatização ou somatogamia, e constitui-se de três fases: plasmogamia, cariogamia e meiose. Ao final do ciclo reprodutivo são formados os ascos, onde são produzidos os ascósporos. Assim como os basidiomicetos os ascomicetos apresentam importância nas áreas médica, industrial, ambiental e agrônoma (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; WEBSTER & WEBER, 2007).

Os *Aspergillus* representam um dos gêneros dos fungos filamentosos economicamente mais importantes, sendo os mais utilizados na produção de diversos produtos, esse gênero têm sido utilizadas como modelo em estudos básicos, porém muitas pesquisas aplicadas têm demonstrado o seu enorme potencial biotecnológico, podem ser utilizadas como fontes de enzimas de interesse industrial e novos fármacos para a indústria farmacêutica (PALLU, 2010; VARGA *et al.*, 2004).

### **3.4 Fermentação em estado sólido**

A fermentação em estado sólido (FES) é um método eficiente de aproveitamento de resíduos sólidos visando à síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial. Os processos fermentativos são aplicados para produção de alimentos, biopesticidas e substâncias químicas diversas. O grande potencial é principalmente na produção de enzimas através de fungos, os quais têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam capacidade de crescimento em baixos níveis de água, a fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes e serve como suporte para o crescimento das células microbianas. O microorganismo cresce em condições semelhantes ao habitat natural e o substrato apresenta alta heterogeneidade para o crescimento microbiano. No processo de destoxificação de torta oriundas da produção de biodiesel o processo de biodestoxificação oferece uma série de vantagens comparando com os métodos químicos e físicos, pois apresentam maior potencial de destoxificação, sendo mais eficientes, menor custo, e produção de produtos adicionais de valor agregado, enzimas de interesse biotecnológico. Entretanto existem algumas desvantagens para esse processo, tais como a cinética da fermentação que é lenta quando comparada aos métodos químicos e físicos, além disso, a segurança do produto depende do metabolismo secundário do microorganismo, pois espécies de fungos podem secretar micotoxinas (ARAÚJO, 2018; PINTO *et al.*, 2005).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção das tortas

As tortas foram obtidas por meio de prensagem mecânica de variedades genéticas de sementes tóxicas de algodão e pinhão-mansão, fornecidas pela Embrapa Agroenergia Brasília-DF.

### 4.2 Coleção de fungos

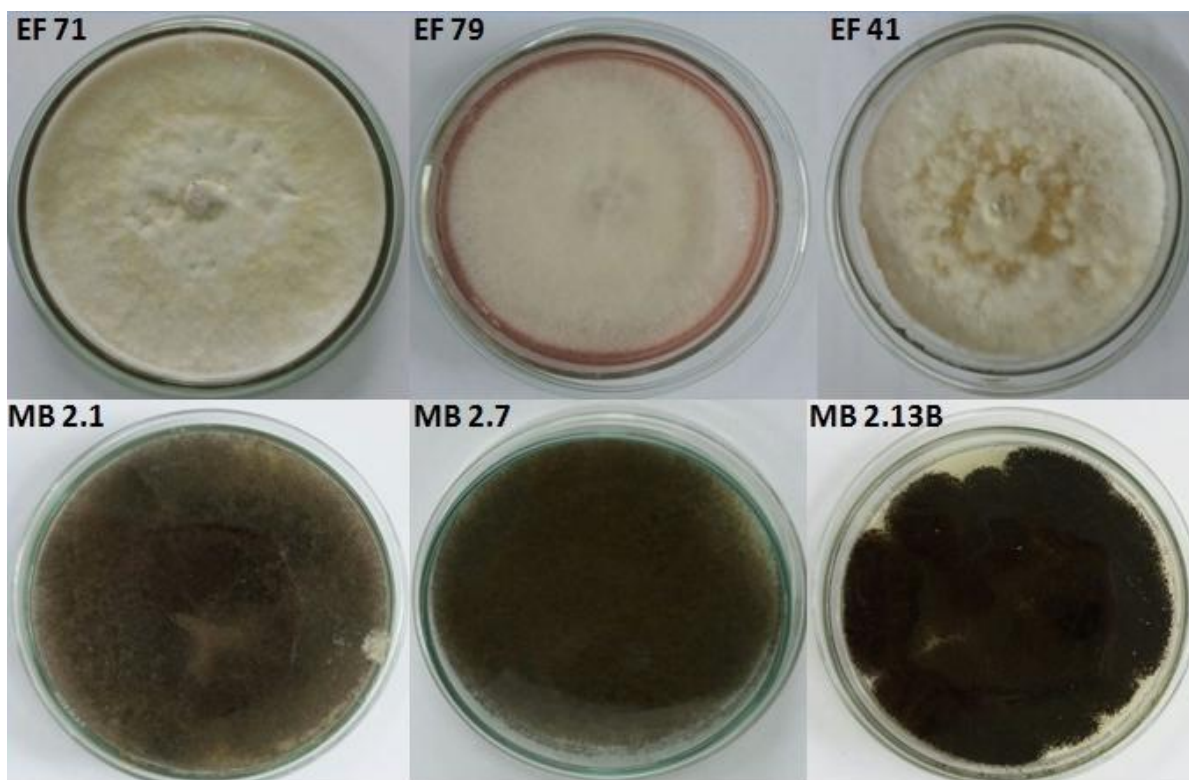
**Tabela1:** Fungos utilizados no processo de cultivo utilizando como substratos torta de caroço de algodão e semente de pinhão-mansão

| Fungos   | Filo          | Nome científico                  |
|----------|---------------|----------------------------------|
| EF 41    | Basidiomiceto | <i>Hydnopolyporus fimbriatus</i> |
| EF 71    | Basidiomiceto | <i>Oudemansiella canarii</i>     |
| EF 79    | Basidiomiceto | <i>Perenniporia spp</i>          |
| MB 2.1   | Ascomiceto    | <i>Aspergillus sp.</i> *         |
| MB 2.7   | Ascomiceto    | <i>Aspergillus sp.</i> *         |
| MB 2.13B | Ascomiceto    | <i>Aspergillus sp.</i> *         |

\* Fungos não identificados quanto à espécie

Os Basidiomicetos pertencem à coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinaria (CMMAABio), da Embrapa Agroenergia. Estes fungos foram selecionados para o estudo devido a estudos realizados anteriormente, no qual foi observado que os mesmos não liberam compostos tóxicos quando cultivados em torta de oleaginosas. Os Ascomicetos pertencem à coleção do Laboratório de Biorrefináveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, de responsabilidade da professora Dr<sup>a</sup> Vivian Machado Benassi, foram isolados de lama da Praia de Regência, Linhares (ES) após o rompimento da barragem de rejeito da mineradora Samarco em Mariana (MG). Estes fungos foram selecionados para o estudo devido a estudos realizados anteriormente sobre o bom crescimento a 30°C, temperatura semelhante ao crescimento dos basidiomicetos também utilizados no experimento. Ainda não foram realizados estudos desses fungos quanto à produção de compostos tóxicos secretados quando cultivados em torta de

oleaginosas. Todos os fungos foram mantidos em meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) e repicados a cada 2 meses para manter sua viabilidade.



**Figura 3:** Fungos utilizados no processo de cultivo estado solido utilizando substratos TCA e TSPM.

### **4.3 Cultivo dos fungos nas tortas**

#### **4.3.1 Cultivo na torta de algodão**

Os cultivos ocorreram em erlenmeyer de 125 mL, com vedação com chumaço de algodão para as trocas gasosas. Usou-se 20g de torta de algodão umedecida com 30 mL de água (umidade de 70%). As amostras foram autoclavadas durante 20 min a 121°C. Após o resfriamento inoculou-se em câmara de fluxo laminar estéril uma placa (Petri 5 cm) completa de micélio de cada fungo (MB 2.1, MB 2.7, MB 2.13B, EF 41, EF 71 e EF 79). O cultivo durou 15 dias em estufa a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicadas.



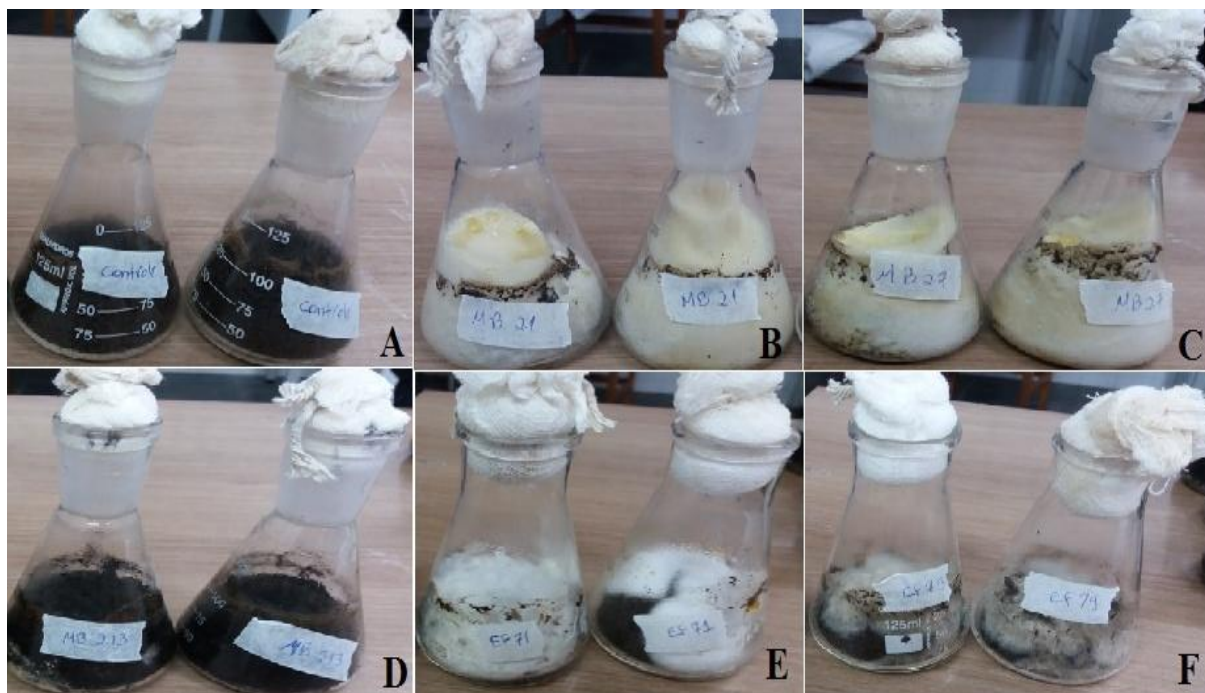
**Figura 4:** Torta de caroço de algodão pré e pós o processo de cultivo fungico.

**Legenda:** **A:** TCA autoclavada por 20 minutos; **B:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.1; **C:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.7; **D:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13B; **E:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 41 **F:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 71 e **G:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 79

#### 4.3.2 Cultivo na torta de pinhão-mansão

Os cultivos ocorreram em erlenmeyer de 125 mL, com vedação com chumaço de algodão para as trocas gasosas. Utilizou-se 40g de torta de pinhão-mansão umedecida com 55 mL de água (umidade em torno de 60%). As amostras da TCA foram autoclavadas durante 20 min a 121°C, após 24hs as amostras foram novamente autoclavadas durante 20 min a 121°C, para garantir a morte de um fungo endolítico resistente. Após o resfriamento inoculou-se em câmara de fluxo laminar estéril uma placa (Petri 5 cm) completa de micélio de cada fungo (MB 2.1, MB 2.7, MB 2.13B, EF 41, EF 71 e EF 79). O cultivo durou 15 dias em estufa a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicadas.





**Figura 5:** Torta de semente de pinhão-mansó pré e pós o processo cultivo fungico.  
**Legenda:** **A:** TSPM autoclavada por 40 minutos; **B:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.1; **C:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.7; **D:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13B; **E:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 71 e **F:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 79

#### 4.4 Extração e determinação das concentrações de gossipol livre

A extração e quantificação do GL foi baseada na metodologia Ba 7–58 recomendada pela AOCS (1985) com modificações feitas por CONCEIÇÃO *et al.* (2015). As amostras de biomassas TCA *in natura*, TCA autoclavada e TCA fermentada foram secas em estufa a 60°C durante 48 horas, trituradas e homogeneizadas usando moinho de bancada. 1 g de amostra foi pesada e acrescida de 10 mL de acetona 70%, agitadas em ultra-som por 5 minutos em tubos falcons. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm, a 8°C e o sobrenadante transferido para tubos falcons e novamente centrifugado. Após o processo de centrifugação os sobrenadantes foram reservados para a quantificação do GL em cromatógrafo líquido de ultra performance (UHPLC). A eluição em UHPLC foi realizada em gradiente com solvente aquoso (ácido trifluoracético 0,1%) e orgânico (metanol 100 %) em coluna C18 da marca Kinetex® (100 mm x 2,10 mm, 2,6 µm) a 35°C. O tempo de corrida foi de 14 minutos com fluxo de 0,4 mL/min. O detector usado foi o PDA (*Photodiode array*), ajustado para aquisição de dados em 254 nm, utilizando como padrão a fórmula a seguir para

construção da curva de calibração nas concentrações de x a y. O gossipol livre residual foi calculado em  $\mu\text{gg}^{-1}$ . O HPLC já oferece os valores de concentração do gossipol, conforme anexo A, resultado representa a concentração de gossipol livre presente na torta.

A porcentagem de degradação de gossipol livre por meio do cultivo utilizando os fungos foi calculada por meio da fórmula:

$$\% = \frac{G1 - G2 \times 100}{G1}$$

Onde:

G1: Gossipol inicial da amostra antes da inoculação dos fungos;

G2: Gossipol remanescente na torta após 15 dias de cultivo dos fungos.

O melhor basidiomiceto e ascomiceto foram selecionados quanto à capacidade de redução de GL na TCA em 15 dias. O cultivo desses fungos foi repetido em triplicata de erlenmeyer de fermentação foi retirada a cada 3 dias, para análise da cinética de degradação do GL. Os erlenmeyers de TCA fermentados por 3, 6, 9, 12 e 15 dias tiveram a torta homogeneizada, seca, triturada e submetida à extração e quantificação de GL pelo método supracitado. Além disso, a TCA fermentada por 15 dias por esses fungos foi utilizada para as análises de compostos fenólicos, atividade antioxidante e composição centesimal.

#### **4.5 Extração e Determinação das concentrações de ésteres de forbol**

Para a extração e quantificação dos ésteres de forbol as amostras de TSPM *in natura*, TSPM autoclavada e TSPM autoclavada e fermentada foram secas em estufa a 60°C durante 48 horas. As amostras foram trituradas com almofariz e pistilo e pesadas 3g em falcons de 50 mL. Nos frascos foram acrescidos 15 mL de metanol, macerados com bastões de teflon por 1 minuto, agitados no ultra-som por 3 minutos em banho de gelo e centrifugadas a 8000 rpm por 8 minutos à temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido três vezes, reunindo-se os sobrenadantes. O metanol foi removido por rotaevaporação a 40°C, sob pressão de 100 mbar. Os resíduos foram ressuspensos com metanol e aliqotado em microtubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL.

Os microtubos foram centrifugados à 14000 rpm por 10 min, a 8°C e 1 mL de cada extrato metanólico foi transferido para vials de 2 mL. A quantificação dos ésteres extraídos foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detector por espectrometria de massas (UPLC-MS), com uma coluna de fase reversa HSS T3. A fase móvel utilizada foi composta de porção aquosa, com ácido fórmico 0,2% e porção orgânica, de acetonitrila 70% e de etanol 30%, com as porções na proporção de 1:1 (v:v) (RIBEIRO *et al.*, 2014). A área representada no cromatograma foi integrada e calculada uma nova área em MS ou PDA. A partir dessa nova área calculou a concentração de ésteres de forbol em µg (Amount), e em seguida calculou a concentração de EF em mgg<sup>-1</sup>, conforme anexo B.

A porcentagem de degradação de ésteres de forbol por meio do cultivo utilizando os fungos foi calculada por meio da fórmula:

$$\% = \frac{E1 - E2 \times 100}{E1}$$

Onde:

E1=Éster de forbol inicial da TSPM antes da inoculação dos fungos;

E2=Éster de forbol remanescente na TSPM após os 15 dias de cultivo dos fungos.

O melhor basidiomiceto e o melhor ascomiceto foram selecionados quanto à capacidade de redução de EF na TSPM em 15 dias. O cultivo desses fungos foi repetido em triplicata de erlenmeyers de fermentação foi retirada a cada 3 dias, para análise da cinética de degradação do EF. Os erlenmeyers de TSPM fermentados por 3, 6, 9, 12 e 15 dias tiveram a torta homogeneizada, seca, triturada e submetida à extração e quantificação de EF pelo método supracitado. Além disso, a TSPM fermentada por 15 dias por esses fungos foi utilizada para as análises de compostos fenólicos, atividade antioxidante e composição centesimal.

#### **4.6 Determinação dos compostos fenólicos totais**

Determinou-se o teor de compostos fenólicos totais em amostras de aproximadamente 0,5g pelo Método Folin-Denis conforme descrito pela AOAC (2005). Os extratos foram obtidos utilizando como solvente metanol 80% em fervura em chapa aquecedora e depois filtrado em papel filtro. Completou-se o volume com água destilada

para 10 mL. Amostras de 20 e 10  $\mu\text{L}$  dos extratos foram acrescidas de 0,5 mL de Folin-Denis e 1,0 mL de carbonato de sódio, completou-se o volume com água destilada para 10 mL. Após repouso de 30 minutos ao abrigo da luz, procederam-se as leituras em espectrofotômetro a 760 nm. A curva analítica foi obtida utilizando solução de ácido tânico  $0,1004 \text{ gL}^{-1}$  com alíquotas de 0,0 mL a 0,7 mL. Os resultados foram expressos em g de ácido tânico/100g de torta.

#### **4.7 Determinação da atividade antioxidante total (AAT)**

Foram preparadas solução de DPPH a  $150 \mu\text{M}$ , solução de trolox  $2000 \mu\text{M}$  e diluições dos extratos em  $1 \text{ mgmL}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mgmL}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mgmL}^{-1}$ . Uma curva padrão de trolox ( $40\text{-}360 \mu\text{M}$ ) também foi preparada. Para a determinação da atividade antioxidante,  $22 \mu\text{L}$  de cada extrato diluído e de cada ponto da curva foram pipetados nos poços de uma microplaca, juntamente com  $200 \mu\text{L}$  da solução de DPPH. Para o controle  $22 \mu\text{L}$  de metanol foi utilizado no lugar da amostra. As leituras de absorbância foram feitas a 520 nm em cinética, a cada 15 minutos, por 1 hora, e a cada 1 hora, por 5 horas. Os dados de inibição da oxidação do DPPH por tempo foram plotados em um gráfico, para determinar o tempo ideal de atividade antioxidante para cada amostra e a atividade em equivalente de trolox utilizado no tempo ideal determinado no passo anterior.

#### **4.8 Composição centesimal**

O teor de umidade das tortas foi quantificado conforme metodologia (925.09) descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). Amostras de 10,0g de cada torta foram submetidas à secagem em estufa a  $50^\circ\text{C}$  até peso constante, sendo o resultado expresso em porcentagem de umidade na matéria seca.

O teor de cinzas foi determinado por incineração de amostras de 2,0 g a  $550^\circ\text{C}$  em forno mufla por período de 4h, aproximadamente, até obter cinzas claras (branco ou cinza claro) (AOAC, 2005/método 923.03), sendo o resultado também expresso em porcentagem de cinzas na torta.

O teor de proteína em amostras de 0,5 g de torta foi avaliado pelo método Kjeldahl, em três etapas: digestão com ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) para a obtenção de sulfato de amônia,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , adição de hidróxido de sódio concentrado ( $\text{NaOH}$ ) e aquecimento para liberação de amônia ( $\text{NH}_3$ ) dentro de um volume conhecido de solução de

ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), com conseqüente formação do borato de amônia ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ) e, por último, titulação com solução de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ). O resultado foi multiplicado pelo fator de conversão utilizado para alimentos em geral (6,25) e expresso em porcentagem de proteína (AOAC, 2005/método 920.87).

A porcentagem de fibra bruta foi quantificada por método gravimétrico. Após digestão em meio contendo ácido acético 70%, ácido tricloroacético e ácido nítrico, o material foi filtrado em cadinho de fundo furado, preenchido com lã de vidro, previamente tarado, e lavado 2 vezes com água destilada quente até retirada total da acidez. Procedeu-se a secagem até peso constante.

O teor de lipídios foi quantificado, de acordo com o método descrito por IAL (2008). Foram pesado aproximadamente 10,0 g de amostra em cartuchos de papel de filtro, e transferidos para o aparelho extrator Soxhlet. Os lipídeos foram extraídos usando éter etílico por aproximadamente 8 horas e coletados em balões de fundo chato previamente aquecidos a  $105^\circ\text{C}$  por três horas, resfriados em dessecador e pesados. Em seguida, os balões foram colocados em estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 40 minutos para evaporação total do éter remanescente no óleo. Após resfriamento em dessecador, procedeu-se a pesagem. Os resultados foram expressos em  $\text{g.100 g}^{-1}$  de lipídeos em amostra integral.

#### **4.9 Análises estatísticas**

Os dados foram avaliados por análise de variância e teste de comparação de médias ao nível de 5% de significância pelo teste de tukey. As análises foram realizadas utilizando o software Sisvar® (versão 17) (FERREIRA, 1998).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.1 Determinação das concentrações de gossipol livre

A tabela 2 mostra as alterações nas concentrações de GL nas TCA com e sem os tratamentos físicos (autoclavagem) e biológicos (fermentação fúngica). Os níveis de gossipol da TCA *in natura* foram de  $8,43 \pm 0,66 \mu\text{gg}^{-1}$ , após a esterilização por autoclavagem houve uma redução do gossipol para  $2,25 \pm 0,16 \mu\text{gg}^{-1}$ , essa redução é promovida pela alta temperatura que degrada o gossipol. Araújo (2018) em seus estudos também observou a redução do teor de gossipol na torta *in natura* de  $40 \mu\text{gg}^{-1}$  para  $13 \mu\text{gg}^{-1}$  após a autoclavagem de 90 minutos. O gossipol pode ser inativado por tratamentos térmicos, embora o uso destes processos térmicos possa formar complexos inertes e indigestíveis entre o gossipol e proteína (THACHER & KIRKWOOD, 1992).

Após a fermentação com os fungos EF 79 (*Perenniporia spp*), EF 71(*Oudemansiella canarii*) e EF 41(*Hydnopolyporus fimbriatus*) o teor de gossipol foi de  $1,12 \pm 0,01$ ;  $1,74 \pm 0,04$  e  $4,15 \pm 0,04 \mu\text{gg}^{-1}$  respectivamente, assim os fungos mostraram potencial para redução do gossipol livre presente na torta. Para os fungos MB 2.7, MB 2.1 e MB 2.13B os níveis observados foram  $2,29 \pm 0,85$ ;  $10,53 \pm 0,06$  e  $50,43 \pm 2,25 \mu\text{gg}^{-1}$  respectivamente. Araújo (2018) conseguiu reduzir em 94% e 93% a concentração de GL em TCA após FES pelos macrofungos *P. ostreatus* CC389 e *F. hepatica* CC102, respectivamente, onde os teores residuais ficaram abaixo de  $1\mu\text{gg}^{-1}$ . No trabalho desta autora os macrofungos *G. frondosa* CC28, *P. eryngii* CC353 e *G. lipiense* CC36 degradaram cerca de 90% do GL, e *P. lecomtei* CC40 75%. Weng & Sun (2006), utilizando fermentação submersa com *C. tropicalis* observou uma redução dos níveis de gossipol foram significativamente reduzidos de 500 e 1000 para 24,4 e 58,8  $\text{mgg}^{-1}$ , respectivamente, com potencial e redução de 95,12% e 94,12% do gossipol livre.

Como pode ser observado na tabela 1, os 3 ascomicetos e o basidiomicetos EF41 (*Hydnopolyporus fimbriatus*) provocou aumento nas concentrações de GL, provavelmente por liberarem o gossipol ligado às proteínas, durante a fermentação.

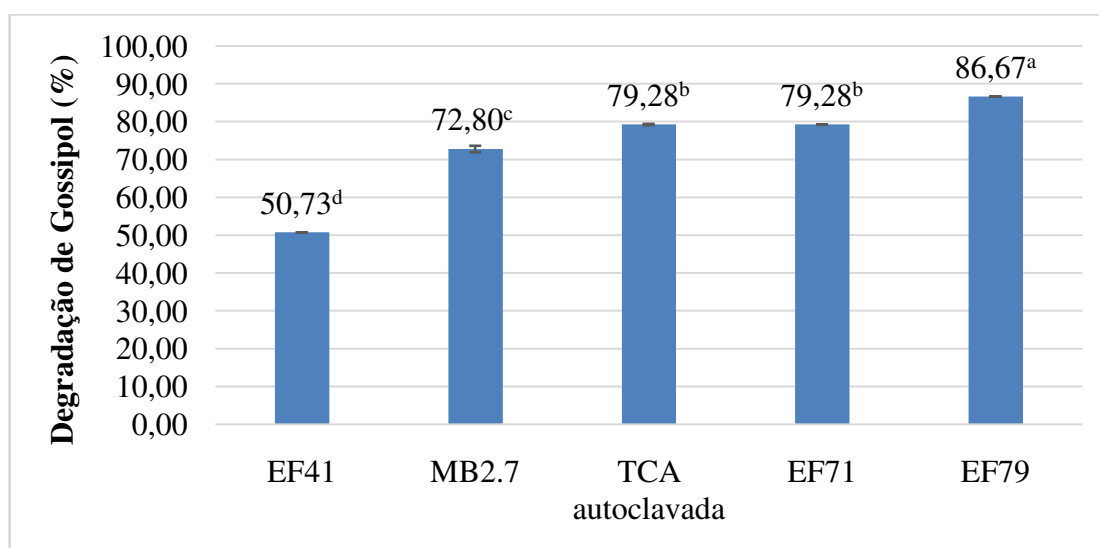
**Tabela 2:** Concentração de gossipol livre ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) presente na torta de caroço de algodão antes e após o processo fermentativo.

| Amostra                                    | Concentração de gossipol livre ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
|--|---|
| TCA <i>in natura</i>                       | $8,43^b \pm 0,66$                                       |
| TCA autoclavada                            | $2,25^{cd} \pm 0,16$                                    |
| EF 41 ( <i>Hydnopolyporus fimbriatus</i> ) | $4,15^c \pm 0,04$                                       |
| EF 71 ( <i>Oudemansiella canarii</i> )     | $1,75^d \pm 0,04$                                       |
| EF 79 ( <i>Perenniporia spp</i> )          | $1,12^d \pm 0,01$                                       |
| MB 2.13B ( <i>Aspergillus sp.</i> )        | $57,43^a \pm 2,25$                                      |
| MB 2.1 ( <i>Aspergillus sp.</i> )          | $10,53^b \pm 0,06$                                      |
| MB 2.7 ( <i>Aspergillus sp.</i> )          | $2,29^{cd} \pm 0,85$                                    |

**Legenda:** TCA *in natura*: TCA sem tratamento físico ou biológico; TCA autoclavada: TCA autoclavada por 20 minutos; EF 41: TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 41(*Hydnopolyporus fimbriatus*); EF 71: TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 71(*Oudemansiella canarii*); EF 79: TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 79 (*Perenniporia spp*); MB 2.1: TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.1 (*Aspergillus sp.*); MB 2.7: TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.7(*Aspergillus sp.*) e MB 2.13B: TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13B (*Aspergillus sp.*). Médias  $\pm$  desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

A figura 6 apresenta o percentual de redução do GL na TCA após os tratamentos físico e biológico, em comparação à *in natura*. O tratamento físico (autoclavagem) da TCA reduziu a concentração de GL em  $79,28 \pm 0,16\%$ , em função da degradação do GL da torta *in natura* e/ou porque esse GL teve o seu processo de conjugação acelerado pelo calor e umidade do processo. Dos três macrofungos utilizados (EF 41, EF 71 e EF 79), o que apresentou maior potencial de redução foi o EF 79 (*Perenniporia spp*), com redução do gossipol em  $86,67 \pm 0,01\%$ , e por isso esse fungo foi selecionado para análise da cinética de degradação e a TCA fermentada por ele foi usada para as próximas análises (caracterização da biomassa).

O potencial de redução dos macrofungo EF 71(*Oudemansiella canarii*) e EF 41(*Hydnopolyporus fimbriatus*) foram  $79,28 \pm 0,04$  e  $50,73 \pm 0,0\%$  respectivamente. Os ascomicetos utilizados não apresentaram potencial de degradação do GL, mas o MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) foi selecionado para a observação da cinética de concentração de GL durante a fermentação, porque não apresentou aumento na concentração do mesmo, o que seria um fator negativo da fermentação.



**Figura 6:** Porcentagem da degradação do gossipol livre na torta de caroço de algodão tratada, quando comparado à concentração do gossipol livre na torta *in natura*. **Legenda:** **EF 41:** TCA fermentada por 15 dias pelo fungo EF 41 (*Hydnopolyporus fimbriatus*); **MB 2.7:** TCA fermentada por 15 dias pelo fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*); **TCA autoclavada:** TCA autoclavada por 20 minutos, sem tratamento fúngico; **EF 71:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 71 (*Oudemansiella canarii*); **EF 79:** TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 79 (*Perenniporia spp*). Médias  $\pm$  desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

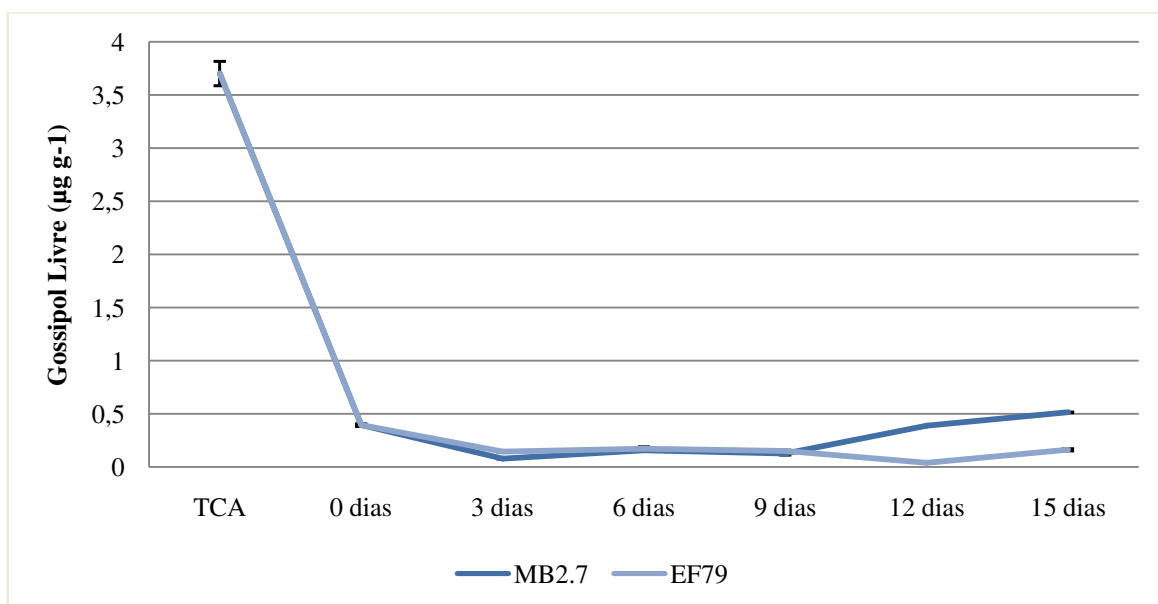
### 5.1.2 Cinética de alteração de GL durante as fermentações

O basidiomicetos EF 79 (*Perenniporia spp*) foi selecionado para análise da cinética de degradação porque foi o melhor em reduzir a concentração de GL na TCA após 15 dias de fermentação, e o ascomiceto MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) foi escolhido por ser o único dos fungos desta classe que não provocou aumento no GL da torta ao fim da fermentação. Na figura 8, pode-se observar que a degradação do gossipol ocorre de forma



efetiva após 3 dias de fermentação, pois a concentração de gossipol sofre uma redução de  $3,70 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$  para  $0,08 \pm 0,0 \mu\text{g g}^{-1}$  com o fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e  $0,14 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$  com EF 79 (*Perenniporia spp.*).

No nono dia do processo fermentativo as concentrações de gossipol livre observados são:  $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$  para o fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e  $0,15 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$  com EF 79 (*Perenniporia spp.*). Após doze dias de fermentação pelo EF 79 observa-se uma pequena redução no teor de GL, enquanto que na fermentação pelo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*), ocorre elevação no teor de GL presente na torta, esse pequeno aumento pode estar relacionado ao desprendimento do gossipol na forma conjugada.



**Figura 7:** Cinética da degradação do gossipol na torta de caroço de algodão após a fermentação. **Legenda:** TCA: torta de caroço de algodão autoclavada; 0 dias: TCA autoclavada, sem tratamento biológico; MB 2.7: TCA com o fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e EF 79: TCA com o fungo EF 79 (*Perenniporia spp.*).

Comparando os valores dos níveis de gossipol na torta autoclavada e após a fermentação com os fungos EF 41 (*Hydnopolyporus fimbriatus*), MB 2.1 (*Aspergillus sp.*) e MB 2.13B (*Aspergillus sp.*), observa um aumento no teor de gossipol. Esse aumento foi provocado pelo microrganismo, provavelmente pela ação de proteases ou grupos de enzimas capazes de clivar a forma conjugada do gossipol a alguns aminoácidos de proteínas. Existem duas formas de gossipol nas plantas, a forma livre e a conjugada. A forma conjugada é produzida através de ligações covalentes do gossipol livre com grupos épsilon-amino de

lisina e arginina, nessa forma de gossipol não é extraível com solventes orgânicos, mas pode ser liberado como gossipol livre por tratamento com ácidos. O gossipol conjugado é formado durante o armazenamento de produtos de algodão e sua formação é acelerada pelo calor e umidade, condições encontradas durante o processamento de sementes de algodão.

Embora o gossipol conjugado seja considerado menos absorvível pelo epitélio intestinal, ocorre à redução da disponibilidade de aminoácidos para a absorção pelo animal, principalmente a lisina, como esse gossipol está na forma ligada a proteínas, sendo excretado pelas fezes do animal sem provocar danos (SOTO-BLANCO, 2008).

Durante o crescimento dos microrganismos EF 41 (*Hydnopolyporus fimbriatus*), MB 2.1 (*Aspergillus sp.*) e MB 2.13B (*Aspergillus sp.*), houve o desprendimento do gossipol ligado, tornando o livre o que elevou o teor deste na torta, tornando os fungos ineficientes para degradação do gossipol da torta, porém testes toxicológicos precisarão ser feitos se houve ou não processo de destoxificação, mesmo com a liberação do gossipol conjugado.

### **5.2.1 Determinação das concentrações dos ésteres de forbol**

O processo de autoclavagem não provocou a redução dos EF, pois estes são estáveis à temperatura. Após 15 dias de fermentação as concentrações dos ésteres de forbol foram reduzidas, como mostra a tabela 3. O teor dos ésteres na torta *in natura* era de  $1,15 \pm 0,02 \text{ mgg}^{-1}$ , após a fermentação com o fungo EF 71 (*Oudemansiella canarii*) o teor observado foi de  $0,09 \pm 0,00 \text{ mgg}^{-1}$  e com o fungo MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) foi de  $0,11 \pm 0,00 \text{ mgg}^{-1}$ . As fermentações pelos fungos MB 2.1 (*Aspergillus sp.*), MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e EF 79 (*Perenniporia spp*) resultaram em concentrações de EF de  $0,42 \pm 0,01$ ;  $0,18 \pm 0,00$  e  $0,68 \pm 0,06 \text{ mgg}^{-1}$  respectivamente. Bose e Keharia (2014) relataram redução dos ésteres de  $1,072 \text{ mgg}^{-1}$  para  $0,28 \text{ mgg}^{-1}$  com *Pleurotus ostreatus*,  $0,37 \text{ mgg}^{-1}$  com *Pleurotus sajor-caju*,  $0,27 \text{ mgg}^{-1}$  com *Pleurotus sapiduse*  $0,38 \text{ mgg}^{-1}$  com *Pleurotus florida* após 20 dias de fermentação. Belewu, e Sam (2010) observaram em seus estudos concentrações de ésteres na torta *in natura* de  $0,13 \text{ mgg}^{-1}$  e após 7 dias de fermentação com *Aspergillus niger* o teor observado foi de  $0,03 \text{ mgg}^{-1}$  após seis dias de fermentação com *Aspergillus versicolor*. Veerabhadrapa *et al.* (2014) relataram redução das concentrações de ésteres de forbol de  $0,832 \text{ mgg}^{-1}$  para  $0,158 \text{ mgg}^{-1}$ . Najjaret *al.* (2014) relatam redução de mais de 96% dos ésteres após um período de 30 dias, onde as concentrações dos ésteres de  $2,78 \text{ mgg}^{-1}$  foram reduzidos para  $0,05 \text{ mgg}^{-1}$  com *Trichoderma harzianum*,  $0,03 \text{ mgg}^{-1}$  com *Paecilomyces*

*sinensis* e  $0,08 \text{ mgg}^{-1}$  com *Cladosporium cladosporioides*. Os níveis de ésteres de forbol presente na TSPM considerado seguro para consumo humano e animal é relatado entre 0,02 e  $0,11 \text{ mgg}^{-1}$  (NAJJAR *et al.*, 2014), dessa forma a torta destoxificada pelos fungo MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) e EF 71(*Oudemansiella canarii*) poderia ser utilizadas para suplementação animal quanto a presença de níveis de EF considerados tóxicos.

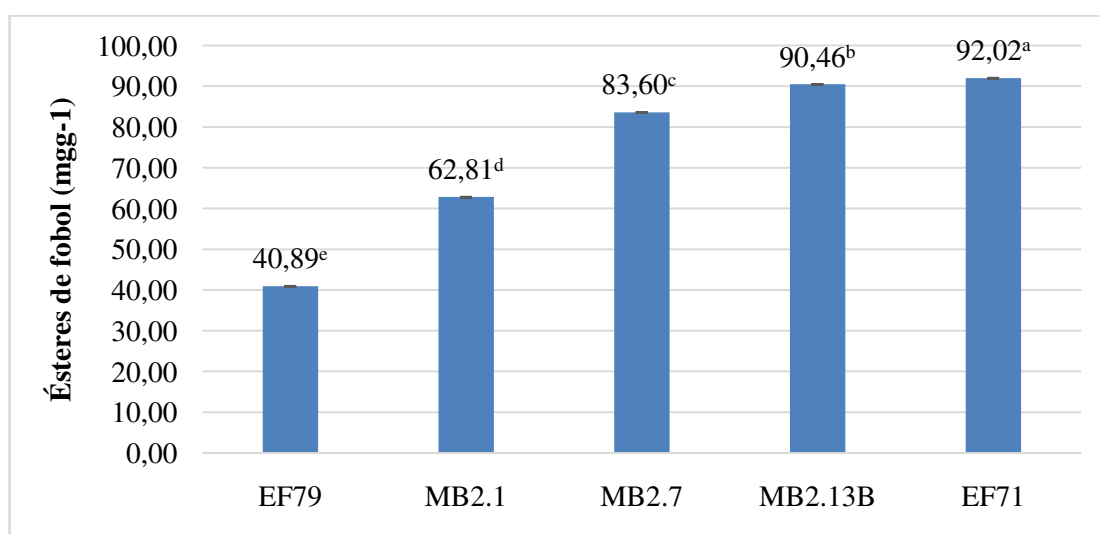
**Tabela 3:** Concentração dos ésteres de forbol ( $\text{mgg}^{-1}$ ) na torta de semente de pinhão manso antes a após o processo fermentativo.

| Amostra                                     | Concentração de ésteres de forbol ( $\text{mgg}^{-1}$ ) |
|---|---|
| <b>TSPM <i>in natura</i></b>                | $1,15^a \pm 0,02$                                       |
| <b>TSPM autoclavada</b>                     | $1,15^a \pm 0,02$                                       |
| <b>EF 79 (<i>Perenniporia spp</i>)</b>      | $0,68^a \pm 0,06$                                       |
| <b>EF 71 (<i>Oudemansiella canarii</i>)</b> | $0,09^b \pm 0,00$                                       |
| <b>MB 2.1(<i>Aspergillus sp.</i>)</b>       | $0,43^b \pm 0,01$                                       |
| <b>MB 2.7(<i>Aspergillus sp.</i>)</b>       | $0,19^b \pm 0,00$                                       |
| <b>MB 2.13B (<i>Aspergillus sp.</i>)</b>    | $0,11^b \pm 0,00$                                       |

**Legenda:** **TSPM *in natura*:** TCA sem tratamento físico ou biológico; **TSPM autoclavada:** TSPM autoclavada por 40 minutos; **EF 79:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 79 (*Perenniporia spp*); **EF 71:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 71(*Oudemansiella canarii*); **MB 2.1:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.1(*Aspergillus sp.*); **MB 2.7:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB2.7(*Aspergillus sp.*) e **MB 2.13B:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13 B (*Aspergillus sp.*). Médias  $\pm$  desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

O fungo EF 41 não obteve crescimento na TSPM. Dos fungos utilizados no processo de fermentação (EF71 EF 79, MB 2.1, MB 2.7 e MB 2.13B), os que apresentaram maiores potenciais para destoxificação da TSPM após 15 dias de fermentação foram EF 71 e MB 2.13B (*Aspergillus sp.*), sendo observado uma redução de  $92,02 \pm 0,00\%$  e  $90,46 \pm 0,00\%$  dos EF, respectivamente. Os fungos *Aspergillus sp.* MB 2.7, *Aspergillus sp.* MB 2.1,

EF 79 (*Perenniporia spp*) apresentaram redução dos ésteres de 83,60 ± 0,00, 62,81 ± 0,01 e 40,89 ± 0,06% respectivamente como mostra a figura 8, este valores estão de acordo com os observados por Barros *et al.*(2011) que relataram redução de 91% e 97% dos ésteres de forbol nas torta de pinhão manso analisadas após 30 dias de incubação com *Bjerkandera adusta* e *Phlebiarufa* , respectivamente. Estudo de Da Luz *et al.* (2014) mostraram redução de 99% nos níveis dos ésteres após 60 dias de cultivo com *Pleurotus ostreatus*. Najjar *et al* (2014) utilizando cepas de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces sinensis* e *Cladosporium cladosporioides* degradação dos ésteres após 30 dias de cultivo com reduções de 99,7%, 98,9% e 96,9%, respectivamente.



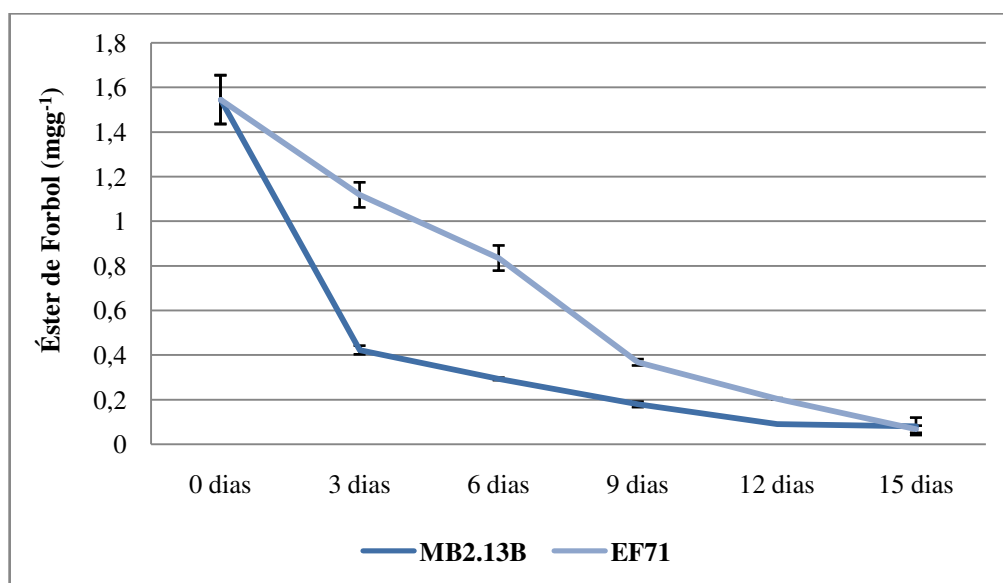
**Figura 8:** Porcentagem de degradação dos ésteres de forbol da torta de semente de pinhão-manso tratada, quando comparado à concentração do gossipol livre na torta *in natura*.

**Legenda:** **EF 79:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 79 (*Perenniporia spp*); **MB 2.1:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.1(*Aspergillus sp.*); **MB 2.7:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*); **MB 2.13B:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13 B (*Aspergillus sp.*) e **EF 71:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 71(*Oudemansiella canarii*). Médias ± desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

### 5.2.2 Cinética de degradação dos ésteres de forbol

Durante os três primeiros dias do processo fermentativo observa a redução da concentração de ésteres de forbol de 1,54 ± 0,11 mgg<sup>-1</sup> da torta *in natura* para 0,42 ± 0,02 mgg<sup>-1</sup> com o fungo MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) e 1,12 ± 0,06 mgg<sup>-1</sup> com EF 71. Após 15 dias de fermentação os índices são reduzidos para 0,080 ± 04 mgg<sup>-1</sup> com *Aspergillus sp.* MB 2.13 B e

$0,07 \pm 0,02 \text{ mgg}^{-1}$  com o fungo EF 71(*Oudemansiella canarii*), como mostra a figura 9. Em 12 dias do processo de fermentação o ascomiceto MB 2.13B a concentração de EF na TSPM é menor que os índices observados com o basidiomicetos EF 71, isso indica que o MB é melhor agente para degradação do EF que o EF71 como mostra a figura 9.



**Figura 9:** Cinética de degradação dos ésteres de forbol na torta de pinhão-manso após a fermentação. **Legenda:** **MB 2.13B:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) e **EF 71:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 71(*Oudemansiella canarii*)

Apesar dos bons resultados obtidos no processo de fermentação para redução dos ésteres de forbol, existem desvantagens para este processo, com a cinética da fermentação que é consideravelmente mais lenta quando comparada aos métodos químicos e físicos. Também segurança do produto depende do metabolismo secundário microbiano, pois espécies de fungos podem secretar micotoxinas, dessa forma a torta estaria com níveis reduzidos dos ésteres porem com presença de outros compostos tóxicos. Estudos mostram que após o processo de degradação da torta houve mortes de animais, ou seja, não houve a destoxificação, mas apenas biotransformação em outros compostos que também eram tóxicos. (ZAIN, 2011). Dos fungos utilizados, os EF 41, EF 71 e EF 79 são espécies que durante o processo de fermentação não liberam toxinas, já os fungos ascomicetos (*Aspergillus*) MB 2.1, MB 2.7 e MB 2.13B ainda estão em fase de avaliação.

### 5.3 Compostos fenólicos

Na tabela 4 estão descritos as variações nos teor de composto fenólicos na TCA e TSPM pré e pós fermentação. O teor dos compostos fenólicos após fermentação na TCA apresentou pequena redução, o mesmo foi observado na TSPM após a fermentação pelo fungo EF 71. Durante processo de fermentação o teor de compostos fenólicos pode sofrer redução pelo uso destes compostos como fonte de nutriente usada pelo fungo, ou pela liberação de enzimas oxidativas durante a fermentação. Os basidiomicetos são amplamente conhecidos por sua habilidade em produzir enzimas extracelulares, tais como as lacases que desempenha um papel importante na reação catalítica que ocorre pela oxidação de um substrato fenólico (KUNAMNENI et al., 2008). A concentração de compostos fenólicos na TSPM após os 15 dias de fermentação pelo fungo MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) apresentou um aumento, isso deve provavelmente pela liberação de compostos fenólicos durante o crescimento do fungo.

**Tabela 4:** Análise da concentração de compostos fenólicos na torta de caroço de algodão e pinhão-manso pré e após processo de fermentação.

| TORTA                 | COMPOSTOS FENÓLICOS (mgg <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|--|
| TCA <i>in natura</i>  | 36,42 <sup>a</sup> ± 0,03                |
| TCA MB 2.7            | 31,78 <sup>a</sup> ± 0,03                |
| TCA EF 79             | 31,00 <sup>a</sup> ± 0,03                |
| TSPM <i>in natura</i> | 23,27 <sup>a</sup> ± 0,02                |
| TSPM MB 2.13B         | 31,91 <sup>a</sup> ± 0,02                |
| TSPM EF 71            | 20,69 <sup>a</sup> ± 0,01                |

**Legenda:** TCA *in natura*: TCA autoclavada por 20 minutos; TCAMB 2.7: TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.7(*Aspergillus sp.*) e TCA EF 79: TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 79 (*Perenniporia spp*), TSPM *in natura*: TSPM autoclavada por 40 minutos; TSPM MB 2.13B: TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13 B (*Aspergillus sp.*) e TSPM EF 71: TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 71(*Oudemansiella canarii*). Medias ± desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

## 5.4 Atividade antioxidante total

Nas amostras de TCA analisadas os valores de antioxidante encontrados foram  $0,68 \pm 0,00 \text{ mgg}^{-1}$  para TCA sem fermentação,  $0,64 \pm 0,00 \text{ mgg}^{-1}$  para TCA com os fungos MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e EF 79 (*Perenniporia spp*), não apresentando alteração após o processo fermentativo. A atividade antioxidante observada não apresentou diferença na torta *in natura* e após o processo fermentativo. A atividade observada na TSPM *in natura* foi de  $0,67 \pm 0,00 \text{ mgg}^{-1}$ , após a fermentação durante 15 dias com o fungo MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) a atividade foi  $0,69 \pm 0,00 \text{ mgg}^{-1}$  e com EF 71 (*Oudemansiella canarii*)  $0,62 \pm 0,00 \text{ mgg}^{-1}$ .

**Tabela 5:** Análise da atividade antioxidante na torta de caroço de algodão e pinhão manso pré e após processo de fermentação.

| TORTA                 | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ( $\text{mgg}^{-1}$ ) |
|-----------------------|--|
| TCA <i>in natura</i>  | $0,68^a \pm 0,00$                            |
| TCA MB 2.7            | $0,64^a \pm 0,00$                            |
| TCA EF 79             | $0,64^a \pm 0,00$                            |
| TSPM <i>in natura</i> | $0,67^a \pm 0,00$                            |
| TSPM MB 2.13B         | $0,69^a \pm 0,00$                            |
| TSPM EF 71            | $0,62^a \pm 0,00$                            |

**Legenda:** TCA *in natura*: TCA autoclavada por 20 minutos; TCAMB 2.7: TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e TCA EF 79: TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 79 (*Perenniporia spp*), TSPM *in natura*: TSPM autoclavada por 40 minutos; TSPM MB 2.13B: TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13 B (*Aspergillus sp.*) e TSPM EF 71: TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 71 (*Oudemansiella canarii*). Medias  $\pm$  desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

## 5.5 Composição centesimal

A composição química das sementes se refere aos constituintes presentes nos tecidos das plantas ou às substâncias de reservas que foram acumuladas no intuito de formar e desenvolver as mesmas. A caracterização desses coprodutos é de extrema importância na avaliação da viabilidade dessas novas oleaginosas, uma vez que a composição dessas tortas e farelos pode ser decisiva na definição de seus usos potenciais.

Na tabela 6 estão descritos os valores encontrados para a análise centesimal da TCA, pré e após fermentação. A matéria seca das amostras TCA pura e com os fungos não apresentaram diferenças significativas, assim como as porcentagens de cinzas, pH, sólidos solúveis totais e acidez titulável. O teor de fibra apresentou um aumento com o fungo MB 2.7, com  $29,00 \pm 1,19$  % em comparação com a torta pura  $27,33 \pm 1,16$ %. O aumento no teor de fibra aumenta a digestibilidade da torta. A fibra vem sendo utilizada para caracterizar os alimentos e para estabelecer limites de inclusão de ingredientes nas rações, entretanto, não existe consenso a respeito da definição de fibra, assim como a respeito da concentração de fibra na dieta que otimiza o consumo de energia. A fibra pode ser definida como sendo o componente estrutural das plantas (parede celular), a fração menos digestível dos alimentos, a fração do alimento que não é digerida por enzimas de mamíferos ou a fração do alimento que promove a ruminação e a saúde do rúmen (WEISS 1993; VAN SOEST, 1994).

**Tabela 6:** Análise da composição centesimal da torta de caroço de algodão antes e após o processo fermentativo.

| COMPONENTES                   | TCA                | MB 2.7             | EF 79              |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Matéria seca</b>           | $50,00^a \pm 2,64$ | $55,33^a \pm 1,86$ | $46,00^a \pm 3,29$ |
| <b>Cinzas</b>                 | $4,66^a \pm 0,47$  | $4,33^a \pm 0,93$  | $3,66^a \pm 1,53$  |
| <b>Fibra bruta</b>            | $27,33^a \pm 1,16$ | $29,00^a \pm 1,19$ | $22,00^a \pm 2,53$ |
| <b>Proteína</b>               | $20,33^a \pm 0,86$ | $18,66^a \pm 0,24$ | $15,00^b \pm 1,14$ |
| <b>Lipídeos</b>               | $8,00^a \pm 1,82$  | $0,66^b \pm 0,11$  | $2,00^b \pm 0,20$  |
| <b>pH</b>                     | $6,00^a \pm 0,04$  | $6,00^a \pm 0,04$  | $5,66^a \pm 0,35$  |
| <b>Sólidos solúveis</b>       | $0,13^a \pm 0,05$  | $0,26^a \pm 0,05$  | $0,26^a \pm 0,11$  |
| <b>Acidez total titulável</b> | $10,66^a \pm 2,5$  | $15,00^a \pm 0,04$ | $13,00^a \pm 0,35$ |

**Legenda:** TCA: TCA autoclavada por 20 minutos; MB 2.7: TCA fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e EF 79: TCA fermentada 15 dias pelo fungo EF 79 (*Perenniporia spp.*). Médias  $\pm$  desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

Observou uma redução do teor de lipídios após o processo de fermentação, a porcentagem apresentada antes da fermentação era de  $8,00 \pm 1,82$ %, após a fermentação os



valores obtidos foram  $0,66 \pm 0,11$  e  $2,00 \pm 0,20$  % para MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e EF 79 (*Perenniporia spp*) respectivamente. A redução dos lipídeos pode estar relacionada à produção de enzimas durante o período da FES. As lipases são enzimas que apresentam importância econômica e possuem como substrato lipídeos, sendo umas das possíveis para produção a partir de resíduos agroindustriais. (SLIVINSKI, 2007).

O teor de proteína bruta é um ponto crucial para tomada de decisão sobre a adoção ou não de um ingrediente em formulações de rações para animais. A TCA após autoclavagem apresentou teor de  $20,33 \pm 0,86\%$  de proteína, após o processo fermentativo houve uma pequena redução do teor, como o fungo MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) o teor observado foi  $18,66 \pm 0,24\%$  e com EF 79 (*Perenniporia spp*)  $15,00 \pm 1,14\%$ . A redução no teor de proteína presente nas sementes após a fermentação é provavelmente devido à utilização de proteína como fonte de nutrientes pelos microorganismos durante a fermentação.

Na tabela 7, está descrito os valores da composição centesimal da TSPM antes e após o processo fermentativo, o percentual de matéria seca obtido para a torta in natura e após o processo de fermentação não apresentou diferenças significativas. O percentual para teor de cinzas não apresentou grande variação na torta pré e pós fermentação, assim como os valores de pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável.

O teor de fibra também não apresentou diferenças significativas, a torta in natura apresentou teor de  $24,97 \pm 7,86\%$ , após a fermentação com o fungo MB 2.13B o teor observado foi de  $21,36 \pm 2,03\%$  e com o fungo EF 71 (*Oudemansiella canarii*) obteve  $21,08 \pm 2,30\%$  de fibra. O teor de fibra bruta é um parâmetro importante para avaliar a composição de um alimento. Composição que apresenta elevados teores de fibra aumenta a digestibilidade do produto.

Estudos sobre a composição indicam que a torta de pinhão-manso é rica em proteína, podendo chegar a 46%, dependendo do método de extração do óleo. Devido ao alto valor proteico, a torta de pinhão-manso possui um potencial para uso na nutrição animal. O teor de proteína observado na TSPM foi de  $13,07 \pm 0,83\%$ , após a fermentação o teor foi elevado para  $22,20 \pm 0,09$  e  $21,70 \pm 0,89\%$  com os fungos MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) e EF 71 (*Oudemansiella canarii*) respectivamente. Durante o processo fermentativo os fungos contribuíram para o aumento das frações de proteínas presente na torta.

O teor de lipídios apresentou uma pequena diminuição após o processo de fermentação, os lipídeos presentes na torta podem servir como um substrato adequado para a produção de enzimas microbianas importantes para aplicações industriais. Durante o processo fermentativo pode ter ocorrido a produção de enzimas que tem como substrato lipídeos.

**Tabela 7:** Composição centesimal da torta de semente de pinhão manso antes após o processo fermentativo.

| COMPONENTES             | TSPM                      | MB 2.13B                  | EF 71                     |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Matéria seca</b>     | 53,07 <sup>a</sup> ± 2,28 | 49,77 <sup>a</sup> ± 2,76 | 48,73 <sup>a</sup> ± 0,76 |
| <b>Cinzas</b>           | 4,27 <sup>b</sup> ± 0,07  | 4,52 <sup>b</sup> ± 0,46  | 5,36 <sup>a</sup> ± 0,26  |
| <b>Fibra bruta</b>      | 24,97 <sup>a</sup> ± 7,86 | 21,08 <sup>a</sup> ± 2,03 | 21,36 <sup>a</sup> ± 3,30 |
| <b>Proteína</b>         | 13,07 <sup>b</sup> ± 0,83 | 22,20 <sup>a</sup> ± 0,90 | 21,70 <sup>a</sup> ± 0,89 |
| <b>Lipídeos</b>         | 10,19 <sup>a</sup> ± 0,05 | 7,14 <sup>a</sup> ± 1,48  | 6,75 <sup>a</sup> ± 2,08  |
| <b>pH</b>               | 5,48 <sup>a</sup> ± 0,18  | 4,98 <sup>b</sup> ± 0,12  | 5,86 <sup>a</sup> ± 0,16  |
| <b>Sólidos solúveis</b> | 0,16 <sup>b</sup> ± 0,05  | 0,30 <sup>a</sup> ± 0,00  | 0,20 <sup>a</sup> ± 0,00  |
| <b>Acidez titulável</b> | 8,597 <sup>b</sup> ± 1,40 | 18,02 <sup>a</sup> ± 2,78 | 17,52 <sup>a</sup> ± 0,56 |

**Legenda:** **TSPM:** TSPM autoclavada por 40 minutos; **MB 2.13B:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo MB 2.13B(*Aspergillus sp.*) e **EF 71:** TSPM fermentada 15 dias pelo fungo EF 71(*Oudemansiella canarii*). Médias ± desvio padrão. As médias com mesma letra não diferem a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Letras iguais médias iguais.

## 6. CONCLUSÃO

Dos três basidiomicetos utilizados, o que apresentou melhor potencial para reduzir a concentração de GL na TCA foi o EF 79 (*Perenniporia spp*) e para reduzir os EF na TSPM foi o EF 71(*Oudemansiella canarii*).

O melhor ascomiceto para degradar o GL na TCA foi MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e os EF na TSPM foi MB 2.13 (*Aspergillus sp.*). Observou-se aumento ou pelo menos a concentração proteína microbiana presente na TSPM após o processo de fermentação do EF 71 (*Oudemansiella canarii*) e MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) e uma redução da proteína após a fermentação da TCA com os fungos MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e EF79 (*Perenniporia spp*).

A inoculação de fungos MB 2.7 (*Aspergillus sp.*) e FE 79 (*Perenniporia spp*) na TCA e MB 2.13B (*Aspergillus sp.*) e EF 71(*Oudemansiella canarii*) na TSPM mostrou ser uma alternativa para agregar valor aos resíduos agroindustrial, possibilitando o seu uso da alimentação animal, após de testes toxicológicos, com a redução de GL na TCA e EF na TSPM aumentando a qualidade das tortas oriundas das indústrias de biodiesel.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- ✓ Identificação do gênero e espécies dos fungos MB 2.1, MB 2.7 e MB 2.13B por análise molecular.
- ✓ Realizar estudo dos fungos quanto à produção de toxinas quando cultivados em fermentação em estado sólido na TCA e TSPM.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L., FILHO, J. C. S., GODOI A. R., CARMO C. A., EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. SPE, p. 260-268, 2008.

ABDEL GADIR, W.S. et al. Comparative toxicity of *Croton macrostachys*, *Jatropha curcas* and *Piper abyssinica* seeds in Nubian goats. **Small Ruminant Research**, v. 48, n. 1, p. 61-67, 2003.

ABREU, J. A. S., ROVIDA, A. F. D. S., & PAMPHILE, J. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review** v.21, n.1,p.55-59. 2015.

AOAC. ASSOCIATION OF ANALITICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. Gaithersburg, Maryland, 18.ed., 2005.

AOCS. Determination of free gossypol. Official method Ba. 7 – 58. Official and Tentative Methods of Analysis. 3rd ed. **American Oil Chemists Society**, Chicago, 1985.

ARAÚJO, A. P. F. **Tratamento da torta de semente de algodão por autoclavagem e macrofungos para degradação de gossipol**. 2018. 89f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2018.

ARAÚJO, A.E., *et al.* Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar. **EMBRAPA Algodão**. 2003.

ARAUJO, A. P. F. et al. Fungos como agentes destoxificadores de torta de caroço de algodão (Gossipol). In: *Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: **ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA**, 2., 2015, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015., 2015.

ARRUDA, F. P. et al. Cultivo do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o Semi-Árido Nordeste. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.1, 2004, p.789-799.

BARROS, C. R. et al. The potential of white- rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 107-110, 2011.

BELEWU, M. A.; SAM, R. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake: proximate composition and antinutritional components. **Journal of yeast and fungal research**, v. 1, n. 3, p. 44-46, 2010.

BELTRÃO, N. E. M., OLIVEIRA, M. I. P. Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel. **Embrapa Algodão-Documents** (INFOTEC-A-E), 2008.

BIODIESEL BRASIL. **Algodão**. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/plantas/algodao/algodao.htm>>. Acesso em 04 de jul. de 2017.

CÂMARA, A. C. L. **Determinação da toxicidade do gossipol em folículos ovarianos de ovelhas**. 2015. 82f. Tese (Doutorado em Produção e Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. **Advances in Botanical Research**, v. 50, p. 39-86, 2009.

CASTILHO; P, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, JR., G. L.; FREIRE, D. M. G. 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid- state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CHANG, C.F. et al. Phorbol esters degradation and enzyme production by bacillus using jatropha seed cake as substrate. **International Journal of Environmental Pollution and Remediation (IJEPR)**, v. 2, n. 1, p. 30-36, 2014.

CONCEIÇÃO, A. A. et al. Validation of a RP-UPLC-PDA method for gossypol determination in cottonseed meal during biodegradation process by fungi. **ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA**, 2., 2015, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015. p. 13-14.

CREMONEZ, P. A. et al. Biodiesel production in Brazil: current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 42, p. 415-428, 2015.

CRUZ, M. R. **Extração de óleo da torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com etanol para remoção de éster de forbol**. 2012. 67f. Dissertação (Ciência e tecnologia de alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

CUNHA, J.R.B, et al. Macrobasidiomicetos da biodiversidade amazônica como agentes degradadores de ésteres forbol. In: *Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: **ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA**, 5., 2018, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2018., 2018.

DA LUZ, J. et al. Bio-detoxification of *Jatropha curcas* seed cake by *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 11, p. 1148-1156, 2014.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v.32, n.3, p.776-792, 2009.

DIEHL, M. S. et al. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 277-284, 2004. Disponível em <[www.cnpa.embrapa.br/linhas\\_ação/grãos\\_fibras](http://www.cnpa.embrapa.br/linhas_ação/grãos_fibras)>. Acesso em 21 Set. de 2017.

DURAES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **Plant Sciences Reviews**, v. 2012, p. 179, 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cadeia produtiva do algodão**. Disponível em <[www.cnpa.embrapa.br/linhas\\_ação/grãos\\_fibras](http://www.cnpa.embrapa.br/linhas_ação/grãos_fibras)>. Acesso em 21 Set. de 2017.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. 2004. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. **Caxias do Sul: Educs**, v. 11, 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar - Sistema de análise de variância para dados balanceados. **Lavras: UFLa**, v. 19, 1998.

GADELHA, I. C. N., RANGEL, A. H. N., SILVA, A. R., SOTO-BLANCO, B. Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.2, p.129-135, 2011.

GOEL, G. et al. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International journal of toxicology**, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

GOMES, A. H. B. *et al.* Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos de touros submetidos a dietas com diferentes níveis de gossipol livre. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 2, p. 161-180, 2014.

GOMES, T. G. **Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-mansão por basidiomicetos e seu potencial como substrato para produção de enzimas de interesse industrial**. 2015. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. 2015.

GOMES, T. G., et al. Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-mansão por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: *Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: **ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA**, 2., 2015, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015., 2015.

GONCALVES, S. B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão-mansão e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio. **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2009.

GRADÉ, J. T.; TABUTI, J. R. S.; VAN DAMME, P. Ethnoveterinary knowledge in pastoral Karamoja, Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 273-293, 2009.

GUBITZ, G.M., MITTELBAH, M., TRABI, M., 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource technology**, v. 67, n. 1, p. 73-82, 1999.

GUEDES, R. E. et al. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: analysis with a central composite rotatable design. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 537-543, 2014.

IEPEC. Instituto de Estudos Pecuários. **Utilização de farelo de algodão na nutrição animal x gossipol**. Disponível em <https://iepec.com/utilizacao-de-farelo-de-algodao-na-nutricao-animal-x-gossipol/>. Acesso 10 de jan de 2019.

ILELABOYE, N. O. A. et al. Determination of minerals and anti-nutritional factors of some lesser-known crop seeds. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 1652-1656, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Procedimentos e Determinações Gerais. In \_\_\_\_\_. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. cap. 4, p. 116-117.

KOGAN, Paul; WALD, Moshe. Male contraception: history and development. **Urologic Clinics**, v. 41, n. 1, p. 145-161, 2014.

KUNAMNENI, A. et al. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, v.7, p. 32–48, 2008.

LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, 2008. p.1969-1975.

LEONETI, A. B, LEONETI, V.A, OLIVEIRA, S. V, W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.

LIM S.J; LEE K.J. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 4, p. 494-503, 2011.

LIN, Y.C.; FUKAYA, T.; RIKIHISA, Y.; WALTON, A. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life Sci.**, v.37, n.1, p.39-47, 1985.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, n. 8, p. 773–787, 2008.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F. & WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p. 3152-3157, 1997.

MARSÍGLIO, B.N. **Utilização de farelo de algodão na nutrição animal X gossipol**. Maringá, PR. 2015. Disponível em: <<http://iepec.com/Utilizacao-de-farelo-de-algodao-na-nutricaoanimal-x-gossipol>> Acesso em: 01 de jul. 2018.

MCCAUGHEY, K. M. et al. Impact of feeding whole Upland cottonseed, with or without cracked Pima cottonseed with increasing addition of iron sulfate, on productivity and plasma gossypol of lactating dairy cattle. **Animal feed science and technology**, v. 122, n. 3-4, p. 241-256, 2005.

MEENA, K. L.; YADAV, B. L. Some ethnomedicinal plants of Southern Rajasthan. **Indian Journal of traditional Knowledge**, v.9, n.1, p. 169-172, 2010.

MOLINARO, Etelcia Moraes et al. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 5. 2012.



MORGAN, S. **Gossypol Toxicity in Livestock**. Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets. Disponível em <<http://osufacts.okstate.edu>> Acesso em 06 de janeiro de 2019.

MOTTA, F. G. Algodão. Perspectiva para a Agropecuária, Brasília, v. 2, p. 11-24, 2014. Disponível em: [conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_09\\_10\\_18\\_03\\_00\\_perspectivas\\_2014-15.pdf](http://conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_10_18_03_00_perspectivas_2014-15.pdf)> Acesso em: 21 jul. 2018.

NAGALAKSHMI, D.; SASTRY, V.R.B.; PAWDE, A. Rumen fermentation patterns and nutrient digestion in lambs fed cottonseed meal supplemental diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 103, n. 1-4, p. 1-14, 2003.

NAJJAR, A. et al. Removal of phorbol esters present in *Jatropha curcas* kernel by fungal isolates. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 16, n. 5, 2014.

NAJJAR, Azhar et al. Detoxification of toxic phorbol esters from Malaysian *Jatropha curcas* Linn. kernel by *Trichoderma* spp. and endophytic fungi. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 2274-2288, 2014.

NASCIMENTO, H. M. A. D. **Caracterização físico-químico e funcional das proteínas de amêndoas do pinhão manso**. 2013. 82f. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimento) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2000.

OWEN, E; SMITH, T; MAKKAR, H. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries: A synthesis of an FAO e-conference. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 3-4, p. 211-226, 2012.

PAIM, T. P. *et al.* Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, n. 3, p. 24-37, 2010.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

PANDEY, V.C. et al. *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2870-2883, 2012.

PEREIRA, M. S. C. **Características da carcaça e da carne de cordeiros Santa Inês alimentados com farelo de mamona destoxificado**. 2011. 119f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PHASUKARRATCHAI, N.; TONTAYAKOM, V.; TONGCUMPOU, C. Reduction of phorbol esters in *Jatropha curcas* L. pressed meal by surfactant solutions extraction. **Biomass and bioenergy**, v. 45, p. 48-56, 2012.

PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2005.

QIAN, S.Z.; JING, G.W.; WU, X.Y.; XU, Y.; LI, Y.Q.; ZHOU, Z.H. Gossypol related to hypokalemia: clinico-pharmacological studies. **Chin. Med. J.**, v.93, p.477-482, 1980.

RAKSHIT, K. D. et al. Toxicity studies of detoxified Jatropha meal (Jatropha curcas) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3621-3625, 2008.

RANDEL, R.D.; CHASE JUNIOR, C.C.; WYSE, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1628-1638, 1992.

RIBEIRO, J. A. de A. et al. Desenvolvimento de método RP-UPLC-PDA para determinação de ésteres de forbol em Jatropha curcas. In: **Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS, 2014, Campos do Jordão. Livro de resumos.[SI]: AB Sciex, 2014., 2014.

RODRIGUES, D. A. **Quantificação e degradação dos ésteres de forbol em torta e farelo de Jatropha curcas L.** 2015. 51f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2015.

RODRIGUES, F. V, RONDINA, D. Alternativas de uso de subprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de ruminantes: glicerina bruta. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.91-99, 2013.

RODRIGUES, J. et al. Variability in oil content and composition and storage stability of seeds from Jatropha curcas L. grown in Mozambique. **Industrial crops and products**, v. 50, p. 828-837, 2013.

ROGERS, G.M.; POORE, M.H.; PASCHAL, J.C. Feeding cotton products to cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 267-294, 2002.

ROMERO, A. C. **Resíduos da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal.** 2013. 113f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2013.

SALDANHA, I. C., BELO, M. A. A. Gossipol: toxicidade dos produtos do algodão. **Boletim Técnico da Universidade Brasil**, Departamento de Produção Animal. UNICASTELO, PMPPA, Descalvado, SP, 2016.

SEAGRI-Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Cultura do Algodão**. Disponível em:< <http://www.seagri.ba.gov.br/Algodao.htm>> Acesso em 06 de janeiro, 2019.

SHARATH, B. S.; MOHANKUMAR, B. V.; SOMASHEKAR, D. Bio-detoxification of phorbol esters and other anti-nutrients of Jatropha curcas seed cake by fungal cultures using

solid-state fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2747-2757, 2014.

SHETTY, S.; UDUPA, S.L.; UDUPA, A.L & VOLLALA, V.R. Wound healing activities of Bark Extract of *Jatropha curcas* Linn in albino rats. **Saudi Medical Journal**, v. 27, n. 10, p. 1473, 2006.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas. 2006. 20p. **Cartilha do Curso de Capacitação de monitores e educadores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente**. São Paulo, 2006.

SINHA, P. et al. Changes in oil content and fatty acid composition in *Jatropha curcas* during seed development. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 508-510, 2015.

SLIVINSKI, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2017. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

SOTO-BLANCO, B. et al. Gossipol e fatores antinutricionais da soja. **Toxicologia Aplicada e Medicina Veterinária**. Manole, Barueri, Brazil, p. 531-545, 2008.

TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

THACKER, Phillip A.; KIRKWOOD, Roy N. **Non-traditional feeds for use in swine production**. CRC Press, 1992.

VAN SOEST, Peter J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell university press, 476p. 2018.

VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. In: **Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi**. Springer, Dordrecht, 2004. p. 627-640.

VEERABHADRAPPA, M. B.; SHIVAKUMAR, S. B.; DEVAPPA, S. Solidstate fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98 **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 208-214, 2014.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for the production of animal feeds. **Animal Feed Science Technology**, v. 98, p.1-12, 2002.

WANG, W.; YUAN, T. .; CUI, B.; DAI, Y. Pretreatment of *Populus tomentosa* with *Trametes velutina* supplemented with inorganic salts enhances enzymatic hydrolysis for ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 2241-2246, 2012.

WEBSTER, J., WEBER, R.W.S. **Introduction to Fungi**. 3rd edition. New York, Cambridge University Press, 2007.

WEISS, W. P. Predicting energy values of feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1802-1811, 1993.

WENG, XIAO-YAN, AND JIAN-YI SUN. Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation . **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 226-232, 2006.

YANG X.; GUO J.; SUN J. Biodegradation of free-gossypol by a new fungus isolated from cotton planted soil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 19, p. 3066-3072, 2011.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

ZHANG, W. J. et al. Optimization of process parameters for reduction of gossypol levels in cottonseed meal by *Candida tropicalis* ZD-3 during solid substrate fermentation. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 221-226, 2006.

ZILIOOTTO, C. H. **Produção de biomassa do cogumelo comestível *Auricularia auricula-judae* em soro de leite**. 1997. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1997.

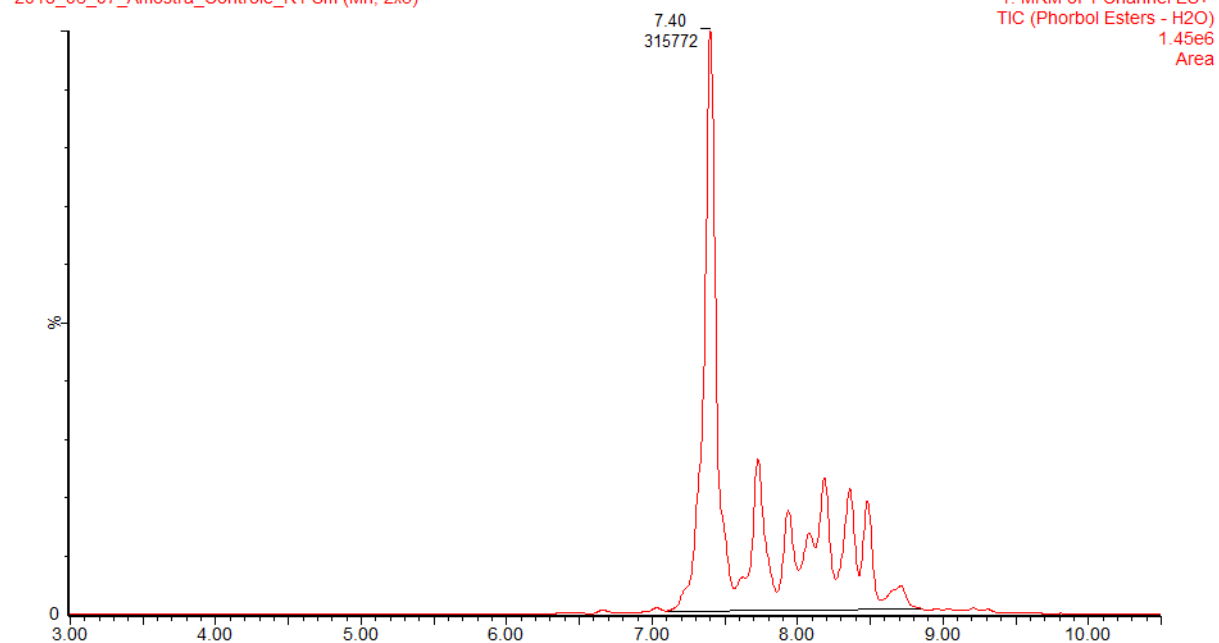
## ANEXO A - RESULTADO HPLC DA TORTA DE ALGODÃO

| Compound 1: Gossypol |                          |         |      |          |       |           |
|----------------------|--------------------------|---------|------|----------|-------|-----------|
|                      |                          |         |      |          |       |           |
| #                    | Name                     | Type    | RT   | Área     | µg/mL | Resultado |
| 24                   | 2018_06_19_TCA_Natura_R1 | Analyte | 3,17 | 10535,99 | 0,770 | 7,7       |
| 25                   | 2018_06_19_TCA_Natura_R2 | Analyte | 3,17 | 12404,03 | 0,897 | 8,97      |
| 26                   | 2018_06_19_TCA_Natura_R3 | Analyte | 3,17 | 11880,53 | 0,862 | 8,62      |
| 27                   | 2018_06_19_Controle_R1   | Analyte | 3,17 | 3072,713 | 0,236 | 2,36      |
| 28                   | 2018_06_19_Controle_R2   | Analyte | 3,17 | 2681,801 | 0,207 | 2,07      |
| 29                   | 2018_06_19_Controle_R3   | Analyte | 3,17 | 3023,904 | 0,233 | 2,33      |
| 60                   | 2018_06_19_EF41-R1       | Analyte | 3,16 | 5446,079 | 0,411 | 4,11      |
| 61                   | 2018_06_19_EF41-R2       | Analyte | 3,16 | 5510,891 | 0,416 | 4,16      |
| 62                   | 2018_06_19_EF41-R3       | Analyte | 3,17 | 5557,35  | 0,419 | 4,19      |
| 63                   | 2018_06_19_EF71-R1       | Analyte | 3,17 | 2311,174 | 0,179 | 1,79      |
| 64                   | 2018_06_19_EF71-R2       | Analyte | 3,17 | 2238,934 | 0,174 | 1,74      |
| 65                   | 2018_06_19_EF71-R3       | Analyte | 3,16 | 2203,943 | 0,171 | 1,71      |
| 66                   | 2018_06_19_EF79-R1       | Analyte | 3,16 | 1424,549 | 0,112 | 1,12      |
| 67                   | 2018_06_19_EF79-R2       | Analyte | 3,16 | 1445,196 | 0,113 | 1,13      |
| 68                   | 2018_06_19_EF79-R3       | Analyte | 3,16 | 1430,072 | 0,112 | 1,12      |
| 69                   | 2018_06_19_MB2-1-R1      | Analyte | 3,17 | 14685,46 | 1,048 | 10,48     |
| 70                   | 2018_06_19_MB2-1-R2      | Analyte | 3,17 | 14863,18 | 1,060 | 10,6      |
| 71                   | 2018_06_19_MB2-1-R3      | Analyte | 3,17 | 14726,5  | 1,051 | 10,51     |
| 72                   | 2018_06_19_MB2-7-R1      | Analyte | 3,16 | 2353,934 | 0,182 | 1,82      |
| 73                   | 2018_06_19_MB2-7-R2      | Analyte | 3,16 | 4307,349 | 0,328 | 3,28      |
| 74                   | 2018_06_19_MB2-7-R3      | Analyte | 3,16 | 2296,984 | 0,178 | 1,78      |
| 75                   | 2018_06_19_MB2-13B-R1    | Analyte | 3,17 | 109399,2 | 5,652 | 56,52     |
| 76                   | 2018_06_19_MB2-13B-R2    | Analyte | 3,17 | 118548,6 | 6,000 | 60        |
| 77                   | 2018_06_19_MB2-13B-R3    | Analyte | 3,16 | 107475,4 | 5,578 | 55,78     |

## ANEXO B - CROMATOGRAMA DOS ÉSTERES DE FORBOL E RESULTADOS DOS CÁLCULOS

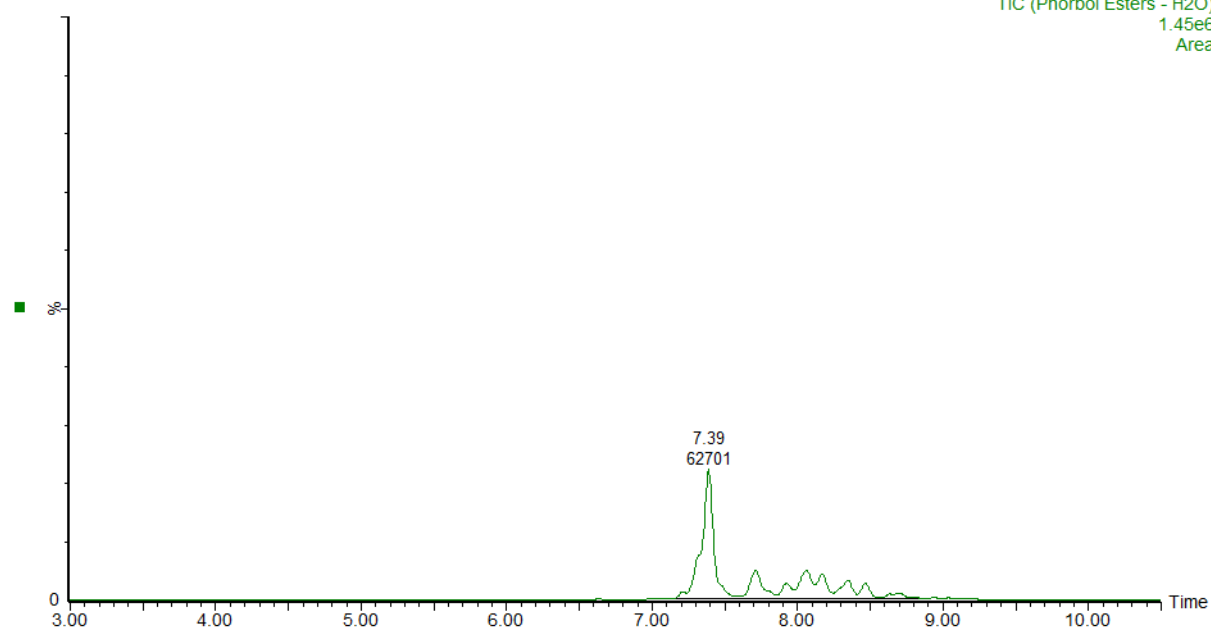
2018\_06\_07\_Amostra\_EF71\_R1

2018\_06\_07\_Amostra\_Controlre\_R1 Sm (Mn, 2x3)



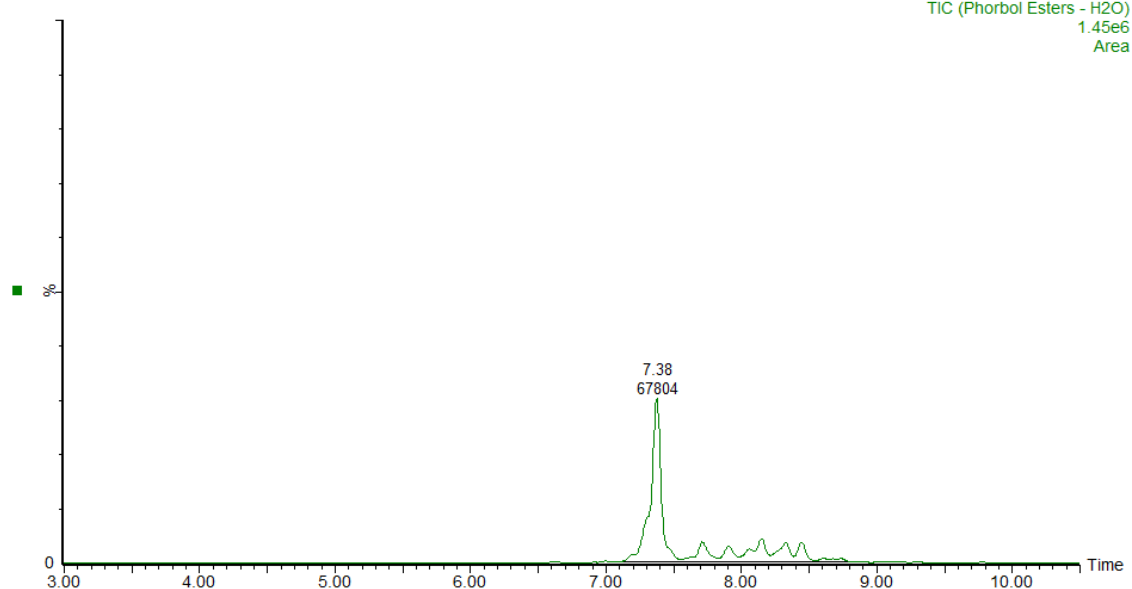
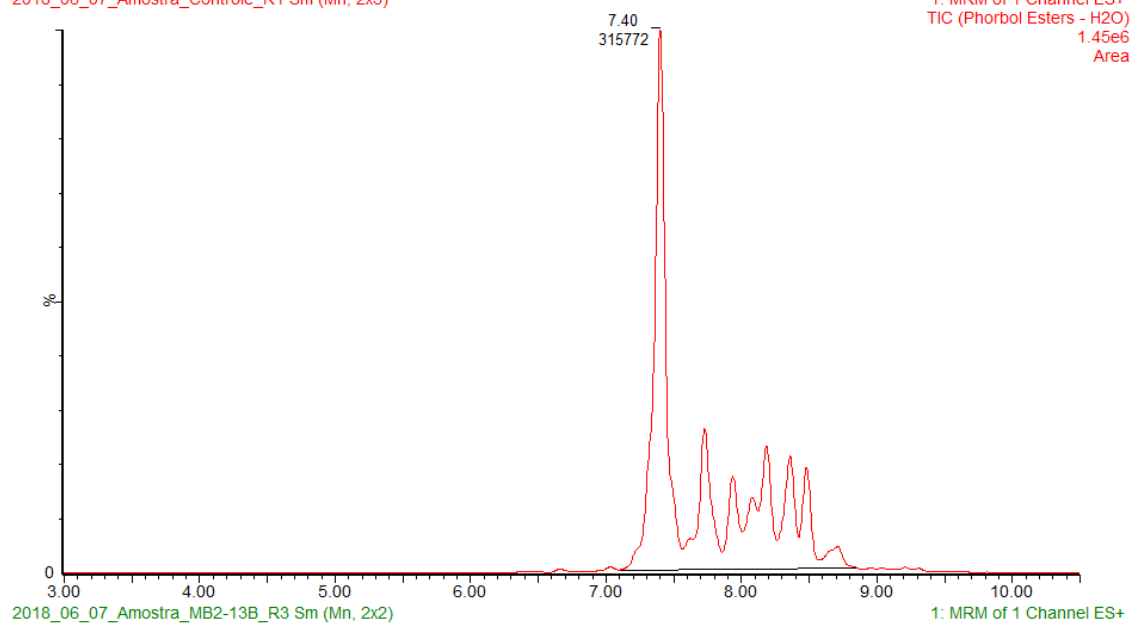
2018\_06\_07\_Amostra\_EF71\_R1 Sm (Mn, 2x2)

1: MRM of 1 Channel ES+  
TIC (Phorbol Esters - H2O)  
1.45e6  
Area



2018\_06\_07\_Amostra\_MB2-13B\_R3

2018\_06\_07\_Amostra\_Controlle\_R1 Sm (Mn, 2x3)



| Extrato Semente Controle |          |             |                     |
|--------------------------|----------|-------------|---------------------|
| Replicata                | Área PDA | Amount (ng) | Concentração (mg/g) |
| 1                        | 20221    | 7806,0      | 6,505               |
| 2                        | 20241    |             |                     |
| 3                        | 20966    |             |                     |
| Media                    | 20476    |             |                     |
|                          |          |             |                     |

|                                 |                |                    |                            |
|---------------------------------|----------------|--------------------|----------------------------|
| <b>Extrato Semente Controle</b> |                |                    |                            |
| <b>Replicata</b>                | <b>Área MS</b> | <b>Amount (ng)</b> | <b>Concentração (mg/g)</b> |
| 1                               | 2473452        | 7806,0             | 6,505                      |
| 2                               | 2437342        |                    |                            |
| 3                               | 2458897        |                    |                            |
| Media                           | 2456564        |                    |                            |
|                                 |                |                    |                            |
| <b>Amostras</b>                 |                |                    |                            |
| <b>Replicata</b>                | <b>Área MS</b> | <b>Amount (ng)</b> | <b>Concentração (mg/g)</b> |
| 2016_08_29_Controle_R1          | 588948         | 1871,5             | 1,560                      |
| 2016_08_29_Controle_R2          | 402043         | 1277,5             | 1,065                      |
| 2016_08_29_Controle_R3          | 393837         | 1251,5             | 1,043                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T1_R1        | 59445          | 188,9              | 0,157                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T1_R2        | 69700          | 221,5              | 0,185                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T1_R3        | 73738          | 234,3              | 0,195                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T2_R1        | 112425         | 357,2              | 0,298                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T2_R2        | 108386         | 344,4              | 0,287                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T2_R3        | 111450         | 354,1              | 0,295                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T3_R1        | 25428          | 80,8               | 0,067                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T3_R2        | 18971          | 109,7              | 0,091                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T3_R3        | 31515          | 100,1              | 0,083                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T4_R1        | 34195          | 108,7              | 0,091                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T4_R2        | 34766          | 110,5              | 0,092                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T4_R3        | 33498          | 106,4              | 0,089                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T5_R1        | 146478         | 465,5              | 0,388                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T5_R2        | 156864         | 498,5              | 0,415                      |
| 2016_08_29_MB2.13B_T5_R3        | 175665         | 558,2              | 0,465                      |
| 2016_08_29_EF71_T1_R1           | 446398         | 1418,5             | 1,182                      |
| 2016_08_29_EF71_T1_R2           | 406752         | 1292,5             | 1,077                      |
| 2016_08_29_EF71_T1_R3           | 227113         | 1313,8             | 1,095                      |
| 2016_08_29_EF71_T2_R1           | 339572         | 1079,0             | 0,899                      |
| 2016_08_29_EF71_T2_R2           | 164623         | 952,3              | 0,794                      |
| 2016_08_29_EF71_T2_R3           | 168444         | 974,4              | 0,812                      |
| 2016_08_29_EF71_T3_R1           | 215744         | 685,6              | 0,571                      |
| 2016_08_29_EF71_T3_R2           | 143426         | 455,8              | 0,380                      |
| 2016_08_29_EF71_T3_R3           | 132866         | 422,2              | 0,352                      |
| 2016_08_29_EF71_T4_R1           | 76358          | 242,6              | 0,202                      |
| 2016_08_29_EF71_T4_R2           | 77915          | 247,6              | 0,206                      |
| 2016_08_29_EF71_T4_R3           | 77719          | 247,0              | 0,206                      |